

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biochemie



Kateřina Vitáčková

Vliv cytokinů na periferní metabolismus glukokortikoidů
Influence of cytokines on peripheral metabolism of glucocorticoids

Diplomová práce

Vedoucí závěrečné práce: prof. RNDr. Jiří Pácha, DrSc.

Praha, 2011

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 30.08.2011

.....

Podpis

Poděkování:

Touto cestou bych velmi ráda poděkovala prof. RNDr. Jiřímu Páchovi, DrSc. za cenné rady, připomínky, trpělivost a čas, který věnoval mé práci. Můj dík rovněž patří Ing. Peteru Ergangovi za odborné rady během experimentální části mé práce. Dále bych chtěla poděkovat prom. biol. Věře Lisé za pomoc s tkáňovými i buněčnými kulturami.

ABSTRAKT.....	3
ABSTRACT	4
SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	5
1 ÚVOD.....	11
2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	13
2.1 Glukokortikoidní hormony	13
2.1.1 Struktura glukokortikoidů	13
2.1.2 Regulace biosynthesy glukokortikosteroidů.....	15
2.1.3 Účinky glukokortikoidů	16
2.1.4 Odbourávání glukokortikoidů	17
2.2 Působení glukokortikoidních hormonů	19
2.2.1 Genomové působení	19
2.2.1.1 Receptory genomového působení	19
2.2.1.2 Interakce hormon - receptor	21
2.2.1.3 Interakce se specifickou vazebnou doménou	23
2.2.1.4 Iniciace transkripce indukovaná glukokortikoidy	24
2.2.1.5 Alternativní účinky komplexu ligand - receptor (včetně netranskripčních)	25
2.2.2 Negenomové působení	26
2.2.2.5 Rychlé účinky (rapid effects) glukokortikoidů	27
2.2.2.6 Glukokortikoidní receptory pro rychlé účinky (rapid effects).....	28
2.3 Steroidní dehydrogenasy	29
2.3.1 11 β -hydroxysteroiddehydrogenasa.....	29
2.3.1.1 11 β -hydroxysteroiddehydrogenasa 1	31
2.3.1.2 11 β -hydroxysteroiddehydrogenasa 2	33
2.4 Regulace zánětu	34
2.4.1 Úloha 11 β -hydroxysteroiddehydrogenas.....	36
3 CÍLE PRÁCE	38
4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	39
4.1 Experimentální model	39
4.2 Příprava tkáňové kultury	39
4.3 Příprava orgánové kultury	40
4.4 Izolace totální RNA.....	41

4.5	Reverzní transkripce	41
4.6	Q-PCR (SYBR Green).....	42
4.7	Q-PCR (Taqman).....	45
4.8	Vyhodnocení.....	46
4.9	Statistické metody	46
5	VÝSLEDKY	48
5.1	Optimalizace experimentálních podmínek	48
5.1.1	Optimalizace podmínek pro udržení střevní primokultury po dobu 3 dní	48
5.1.2	Optimalizace normalizačního faktoru (housekeeping genu)	50
5.2	Ovlivnění střevní primokultury a buněčné linie HT-29 přidavkem IL-1 β a TNF- α	51
6	DISKUSE	56
6.1	Optimalizace podmínek pro udržení střevní primokultury po dobu 3 dní.....	56
6.2	Výběr normalizačního faktoru (housekeeping genu).....	57
6.3	Ovlivnění střevní primokultury a buněčné linie HT-29 přidavkem IL-1 β a TNF- α	58
7	ZÁVĚR.....	62
	POUŽITÁ LITERATURA.....	64

ABSTRAKT

11 β -hydroxysteroiddehydrogenasa (11 β HSD) se podílí na prereceptorovém metabolismu glukokortikoidů přeměnou jejich aktivní formy (kortisolu či kortikosteronu) na formu inaktivní (kortison či 11-dehydrokortikosteron), čímž reguluje koncentraci a aktivitu glukokortikoidů v organismu. Zatímco 11 β HSD typu 1 (11 β HSD1) aktivuje glukokortikoidy z jejich biologicky neaktivní keto-formy, 11 β HSD typu 2 (11 β HSD2) má za úkol jejich opětovnou biologickou inaktivaci. Předchozí *in vivo* studie vlivu prozánětlivých cytokinů prokázaly, že exprese mRNA pro 11 β HSD1 a 11 β HSD2 a jejich enzymatické aktivity mohou být pozměněny působením těchto cytokinů, například IL-1 β a TNF- α . Cílem této práce bylo zjistit, zda se tyto cytokiny podílejí na změnách exprese 11 β HSD v orgánových explantátech distálního tračníku a zda je změna exprese 11 β HSD2 vyvolána přímým působením cytokinů na epitheliální buňky. Ze všech vzorků byla izolována totální RNA, která byla pomocí reversní transkripce převedena na cDNA. Poté byla změřena hladina transkripčního produktu pro 11 β HSD1 a 2 a daného normalizačního faktoru (housekeeping genu) pomocí Q-PCR. U orgánových kultur distálního tračníku došlo po inkubaci s TNF- α (10 ng/ml; 48 hodin) k signifikantnímu zvýšení exprese 11 β HSD1, ale neprokázal se vliv na 11 β HSD2. Expozice orgánových kultur distálního tračníku působení IL-1 β (10 ng/ml; 48 hodin) vyvolala signifikantní snížení exprese 11 β HSD2, zatímco na 11 β HSD1 neměl IL-1 β vliv. Pro zjištění, zda ke změně 11 β HSD2 dochází přímým působením cytokinů na epitheliální buňky, nebo zda je tento efekt vyvolán působením jiných buněk střeva ovlivňujících expresi v buňkách epitheliálních, byl proveden experiment s epitheliální buněčnou linií HT-29. Inkubace HT-29 s IL-1 β o koncentraci 10 ng/ml a 100 ng/ml ani s TNF- α o koncentraci 25 ng/ml a 250 ng/ml nevyvolala žádnou změnu exprese 11 β HSD2.

ABSTRACT

11 β -hydroxysteroid dehydrogenase (11 β HSD) participates in prereceptor metabolism of glucocorticoids by conversion of their active forms (cortisol or corticosterone) to inactive forms (cortisone or 11-dehydrocorticosterone), thereby regulating concentration and activity of glucocorticoids in organism. 11 β HSD type 1 (11 β HSD1) activates glucocorticoids from their biologically inactive keto-forms, whereas the role of 11 β HSD type 2 (11 β HSD2) is their biological reactivation. Previous *in vivo* studies showed that mRNA expression and enzyme activity of 11 β HSD1 or 2 can be modified by influence of these cytokines, for example IL-1 β and TNF- α . The aim of this study was to determine whether these cytokines play a role in regulation of 11 β HSD expression in distal colon organ cultures and whether the changes of 11 β HSD2 expression are induced by a direct effect of cytokines on epithelial cells. Total RNA was isolated from all samples and RNA was transformed to cDNA by reverse transcription. Subsequently mRNA of 11 β HSD1 or 2 and the given housekeeping gene was measured by Q-PCR. Incubation of distal colon organ cultures with TNF- α (10 ng/ml; 48 hours) caused significant increase of 11 β HSD1 expression, but no influence on 11 β HSD2 expression was observed. In contrast, the expression of 11 β HSD2 but not 11 β HSD1 was significantly upregulated in the presence of IL-1 β (10 ng/ml; 48 hours). To examine whether the changes of 11 β HSD2 expression are caused by a direct effect of cytokines on epithelial cells or whether this effect is induced by an influence on other cells of colonic mucosa, an experiment with epithelial cell line HT-29 was designed. Incubation of HT-29 neither with IL-1 β (10 ng/ml and 100 ng/ml) nor with TNF- α (25 ng/ml and 250 ng/ml) induced any changes of 11 β HSD2 expression.

(In Czech)

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

11 β HSD - 11 β -hydroxysteroiddehydrogenasa

11 β HSD1 - 11 β -hydroxysteroiddehydrogenasa typu 1

11 β HSD2 - 11 β -hydroxysteroiddehydrogenasa typu 2

18SRNA - 18S podjednotka ribosomální RNA

A - adenin

ACTH - adrenocorticotropic hormone, adrenokortikotropní hormon

AR - androgen receptor, receptor pro androgen

ASC - adipose stromal cells, stromální adipocyty

ATCC - American Type Culture Collection

C - cytosin

C/EBP α - CCAAT/enhancer-binding protein α

C/EBP β -LAP - CCAAT/enhancer-binding protein β - liver enriched activator protein

cAMP - cyclic adenosine monophosphate, cyklický adenosinmonofosfát

CBG - corticoid binding globulin, kortikoidy vázající globulin

CBP - CREB binding protein, protein vázající CREB

CC10 - clara cell 10 kDa protein, 10kDa protein clara buněk

CD - Crohn's disease, Crohnova choroba

cDNA - complementary DNA, komplementární DNA

COX-2 - cyklooxygenasa 2

cPLA₂ - cytoplasmic phospholipase A₂, cytoplasmatická fosfolipasa A₂

CREB - cAMP response element binding protein, protein vázající cAMP responzivní

element

CRH - corticotropin releasing hormone, kortikotropin uvolňující hormon

Ct - threshold cycle, prahový cyklus

DBD - DNA-binding domain, DNA-vazebná doména

DMEM - Dulbecco's modified Eagle's medium nebo Dulbecco/Vogt modified Eagle's
minimal essential medium

DNA - deoxyribonucleic acid, kyselina deoxyribonukleová

dNTP mix - směs primerů pro PCR (dATP, dCTP, dTTP, dGTP)

DSS - dextran sulfate sodium, dextran síran sodný

DTT - dithiothreitol

EDTA - ethylenediaminetetraacetic acid, kyselina ethylendiamintetraoctová

EGF - epidermal growth factor, epidermální růstový faktor

ER - estradiol receptor, receptor pro estradiol

FBS nebo FS - fetal bovine serum, fetální hovězí sérum nebo fetální sérum

FCS - fetal calf serum, fetální telecí sérum

G - guanin

GAPDH - glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase,

glyceraldehyd-3-fosfátdehydrogenasa

GBD - glucocorticoid-binding domain, glukokortikoidy vázající doména

GC - glucocorticoid, glukokortikoid

G-CSF - granulocyte colony-stimulating factor, růstový faktor stimulující tvorbu kolonií
granulocytů

GMC - glomerular mesangial cells, glomerulární mesangiální buňky

GM-CSF - granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, růstový faktor stimulující tvorbu kolonií granulocytů a makrofágů

GR - glucocorticoid receptor, glukokortikoidní receptor

GRE - glucocorticoid response element, glukokortikoidně responzivní element

H6PDH - hexose-6-phosphate dehydrogenase, hexosa-6-fosfátdehydrogenasa

HPA osa - hypothalamic-pituitary-adrenal axis, hypothalamo-hypofyso-adrenokortikální osa

HRE - hormone response element, hormonálně responzivní element

HSD - hydroxysteroid dehydrogenase, hydroxysteroiddehydrogenasa

HSP - heat shock protein, protein teplotního šoku

IBD - inflammatory bowel disease, nespecifické záněty střeva

IFN- γ - interferon γ

IGF-1 - insuline-like growth factor 1, inzulinu podobný růstový faktor 1

IL-1 - interleukin 1

IL-10 - interleukin 10

IL-11 - interleukin 11

IL-12 - interleukin 12

IL-13 - interleukin 13

IL-1R1 - receptor pro IL-1 typu 1

IL-1R2 - receptor pro IL-1 typu 2

IL-1 β - interleukin 1 β

IL-2 - interleukin 2

IL-3 - interleukin 3

IL-4 - interleukin 4

IL-5 - interleukin 5

IL-6 - interleukin 6

IL-8 - interleukin 8

IL-9 - interleukin 9

iNOS - inducible nitric oxide synthase, inducibilní synthasa oxidu dusnatého

I κ B - inhibitor kappa B

I κ B α - inhibitor kappa B α

I κ B β - inhibitor kappa B β

K_d - disociační konstanta komplexu enzym-substrát

K_m - Michaelisova konstanta

KSR - ketosteroid reductase, ketosteroidreduktasa

LDL - low density lipoprotein, protein s nízkou hustotou

LPS - lipopolysacharid

MCP-1 (3,4) - monocyte chemoattractant protein 1 (3,4)

mGR - membrane glucocorticoid receptor, membránový glukokortikoidní receptor

MKP-1 - mitogen-activated protein kinase phosphatase, mitogeny aktivovaná
proteinkinasa fosfatasa

M-MLV - Moloney murine leukemia virus, myší leukemický virus Moloney

MR - mineralocorticoid receptor, mineralokortikoidní receptor

mRNA - messenger RNA, mediátorová RNA

NAD⁺ - nicotinamide adenine dinucleotide, nikotinamidadenindinukleotid (oxidovaný)

NADH - nicotinamide adenine dinucleotide, nikotinamidadenindinukleotid (redukovaný)

NADP⁺ - nicotinamide adenine dinucleotide phosphate,
nikotinamidadenindinukleotidfosfát (oxidovaný)

NADPH - nicotinamide adenine dinucleotide phosphate,
nikotinamidadenindinukleotidfosfát (redukovaný)

NF- κ B - nuclear factor kappa B, nukleární faktor kappa B

p38 MAPK - P38 mitogen-activated protein kinases, mitogeny aktivované proteinkinasy

P450_{scc} - cholesterol side-chain cleavage enzyme, enzym ze skupiny cytochromů P450
odštěpující postranní řetězec cholesterolu

PCR - polymerase chain reaction, řetězová polymerasová reakce

PLA₂ - phospholipase A₂, fosfolipasa A₂

PR - progesterone receptor, receptor pro progesteron

Q-PCR - quantitative PCR, kvantitativní PCR

RNA - ribonucleic acid, kyselina ribonukleová

SCF - stem cell factor, růstový faktor kmenových buněk

SDS - short chain dehydrogenase/reductase family, rodina dehydrogenas/reduktas s
krátkým řetězcem

SEM - standard error of mean, směrodatná odchylka průměru

SRC-1 - steroid receptor coactivator 1, koaktivátor steroidního receptoru 1

T - thymin

TNBS - 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid, kyselina 2,4,6-trinitrobenzensulfonová

TNF- α - tumor necrosis factor α , faktor nekrotizující nádory α

UC - ulcerative colitis, ulcerózní kolitida

VDR - vitamin D₃ receptor, receptor pro vitamin D₃

1 ÚVOD

Gastrointestinální trakt, obzvláště pak střevo, je v neustálém kontaktu se symbiotickými bakteriemi. Kromě toho je alespoň občas vystaven působení mikroorganismů z potravy a vody s patogenním nebo potenciálně patogenním účinkem. Z toho vyplývá potřeba zvýšené obranyschopnosti, a to zejména v období rané ontogeneze, kdy ještě není v činnosti aparát adaptované imunity, a obrana organismu je zajišťována pouze imunitou vrozenou. Vrozená imunita je vývojově velmi starý mechanismus a lze ji definovat jako schopnost zachytit a eliminovat patogen bez potřeby předchozího kontaktu. Základním projevem snahy organismu o odstranění patogenů a opravu poškozené tkáně je zánět. K nejúčinnějším a nejčastěji využívaným protizánětlivým farmakům patří zejména glukokortikoidy. K jejich produkci v organismu dochází v kůře nadledvin (glandulae suprarenalis) po aktivaci systému hypothalamus-hypofýza-nadledvina (HPA osa) prozánětlivými cytokiny [McEwen a kol., 1997], jako jsou například $\text{TNF-}\alpha$ či $\text{IL-1}\beta$ [Besedovsky a del Rey, 1996]. Biologická aktivita glukokortikoidů v cílových tkáních ovšem nezávisí pouze na plasmatické koncentraci, množství glukokortikoidních receptorů nebo schopnosti cílové buňky reagovat na dané podněty, ale také na jejich lokálním metabolismu, který je katalyzován 11β -hydroxysteroiddehydrogenasami [Draper a Stewart, 2005]. Zájem o tyto dehydrogenasy vzrůstá již od 80. let, kdy byla poprvé zjištěna aktivita 11β HSD ve střevní mukose [Burton a Anderson, 1983]. Vzrůst zájmu je spojen s úlohou 11β HSD v patogenesi lidské obezity a insulinové resistance, Crohnovy choroby, ulcerózní kolitidy, glaukomu, osteoporose a také u nádorových onemocnění.

Byly popsány dva enzymy, které řídí konverzi neaktivní formy 11-dehydroglukokortikoidu (11-dehydrokortikosteron či kortison) na formu aktivní 11-hydroxykortikoid (kortikosteron či kortisol). 11β HSD1 pracuje *in vivo* převážně jako reduktasa, čímž produkuje aktivní glukokortikoidy, které se pak mohou navázat na glukokortikoidní receptory. Kdežto 11β HSD2 působí striktně jako dehydrogenasa, která oxidací mění biologicky aktivní formu glukokortikoidu (kortikosteron a kortisol) v její inaktivní 11-oxo derivát (11-dehydrokortikosteron a kortison). Exprese 11β HSD1 je vysoká zejména v neepiteliálních buňkách lamina propria a buňkách imunitních. Na druhou stranu vysokou expresi 11β HSD2 vykazují buňky epitheliální.

V řadě studií bylo prokázáno, že expozice prozánětlivému stimulu, jakým jsou například cytokiny TNF- α a IL-1 β , vede v některých buňkách ke zvýšení exprese 11 β HSD1 a naopak ke snížení exprese 11 β HSD2 [Escher a kol., 1997; Thieringer a kol., 2001; Cooper a kol., 2001; Cai a kol., 2001]. Tyto poznatky vedly k hypotéze, že zvýšení množství uvedených cytokinů působí jako zpětná vazba na produkci glukokortikoidů, čímž vyvolá změny v jejich synthese a koncentraci. Tato hypotéza byla podpořena studiemi na pacientech s kolitidou [Žbáňková a kol., 2007] a rovněž na zvířecích modelech *in vivo* [Ergang a kol., 2008; Bryndová a kol., 2004; Vágnerová a kol., 2006].

Cílem mé práce bylo ověření těchto studií *in vitro* na orgánových kulturách distálního tračníku, optimalizace podmínek pro udržení těchto orgánových kultur a volba vhodných normalizačních faktorů pro jednotlivé experimenty. Orgánové kultury byly inkubovány s přidavkem prozánětlivých cytokinů TNF- α a IL-1 β , bylo tedy vytvořeno prostředí zánětu. Poté byl navržen experiment pro specifikaci části tračníku, kde ke změnám exprese 11 β HSD dochází. Pro tento experiment byla využita epitheliální buněčná linie HT-29, která byla rovněž inkubována s prozánětlivými cytokiny TNF- α a IL-1 β .

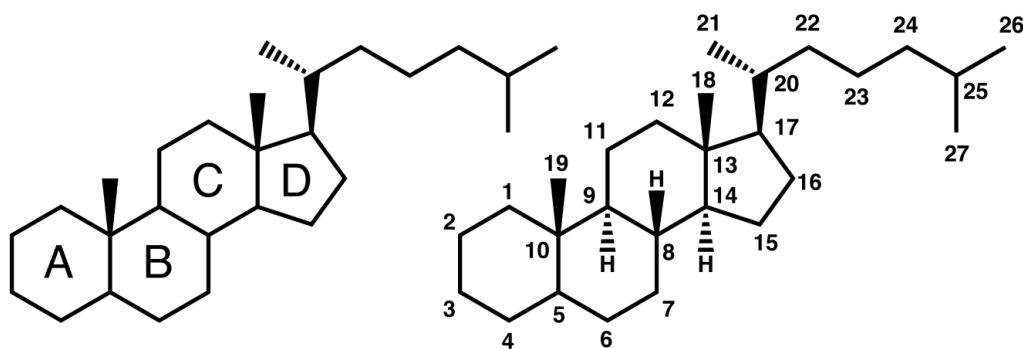
2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

2.1 GLUKOKORTIKOIDNÍ HORMONY

2.1.1 STRUKTURA GLUKOKORTIKOIDŮ

Protizánětlivé reakce jsou součástí vrozené imunity, která je první linií obranného mechanismu chránícího organismus po zranění před invazí patogenů a opravujícího poškozenou tkáň. Typické příznaky zánětu jsou zarudnutí, otok, teplota a bolest, které jsou následkem uvolnění prozánětlivých mediátorů zánětu (např. tumor necrosis factor- α ; TNF- α) a zvýšení vazodilatace a kapilární propustnosti umožňující přístup leukocytů k postižené tkáni. Glukokortikoidy patří dosud k nejvýznamnějším protizánětlivým farmakům.

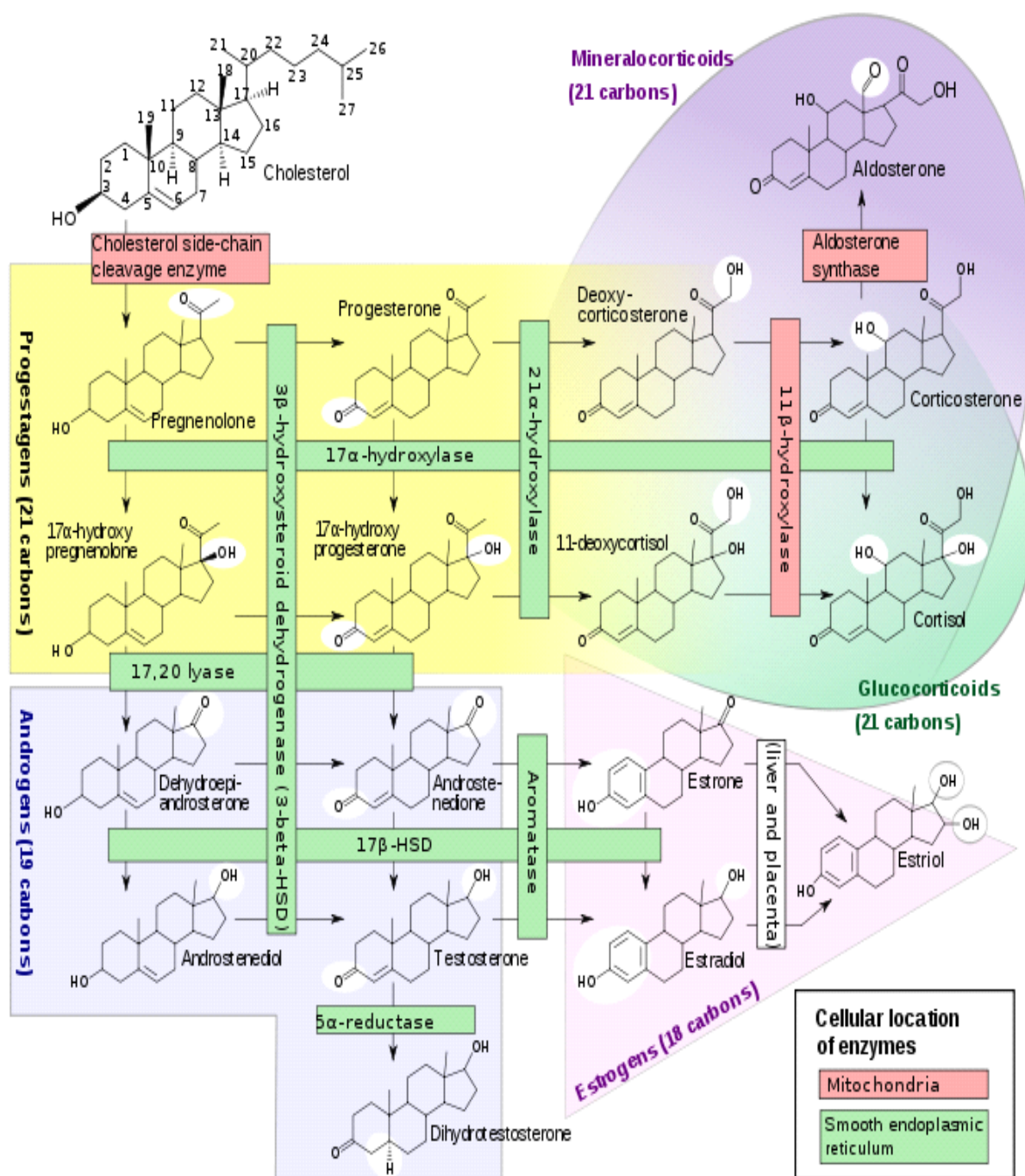
Glukokortikoidní hormony patří mezi C-21 steroidy, jejichž základem je cyklopentanoperhydrofenantrenový skelet tvořený sedmnácti uhlíky. Fyziologický účinek je u všech glukokortikoidů podmíněn přítomností hydroxylu na C11. Nejvýznamnějšími glukokortikoidy jsou kortisol u většiny savců a u lidí a kortikosteron u hlodavců, tyto představují aktivní formy. Naopak kortison a 11-dehydrokortikosteron jsou formy neaktivní, mající na C11 keto skupinu.



Obr. 2.1 Číslování uhlíků steroidního skeletu (A-C cyklohexanové kruhy, D cyklopentan).

Všechny steroidy sdílí podobnou cyklopentanoperhydrofenantrenovou strukturu a také vznikají téměř stejnou cestou, a to proto, že pro všechny slouží jako prekursor stejná látka, cholesterol (obrázek 2.1). Ten může být syntetisován *de novo* z acetátu (nadledviny, varlata, vaječníky), ale většinou slouží jako zdroj cholesterolu zásoba

v plazmatických LDL lipoproteinech a jeho využívání stimulují tropní hormony, které hrají roli hlavně při aktivaci steroidogenese [Heikkilä a kol., 2002].



Obr. 2.2 Biosynthesa steroidů (cholesterol side-chain cleavage enzyme - P-450_{scc}, cytochrom-P-450 odštěpující postranní řetězec).

Biosynthesa steroidních hormonů začíná v mitochondriích odštěpením isokaproaldehydu (C6) z molekuly cholesterolu. Proces steroidogenese zobrazuje obrázek 2.2 (str. 14). Za katalysy mitochondriálním enzymem označovaným jako P450_{scc} (cholesterol side-chain cleavage enzyme) vzniká pregnenolon, který je prekursorem všech steroidních hormonů (kromě kalcitriolu). Pregnenolon je za účasti enzymů dále přeměňován v endoplasmatickém retikulu či v mitochondriích na steroidní hormony a jejich prekursory. Z pregnenolonu poté vznikají 17-hydroxysteroidy a 17-deoxysteroidy. Meziprodukty jsou dále přeměňovány pomocí enzymu 3 β -hydroxysteroiddehydrogenasa- $\Delta^{5,4}$ -izomerasy z hladkého endoplasmatického retikula a jinými enzymy až na kortisol a kortikosteron.

2.1.2 REGULACE BIOSYNTESY GLUKOKORTIKOSTEROIDŮ

Za normálních okolností jsou steroidní hormony produkovány po aktivaci systému hypothalamus-hypofyza-nadledvina, tzv. HPA osy (hypothalamic-pituitary-adrenal axis), v kůře nadledvin (glandulae suprarenalis), což jsou párové endokrinní žlázy umístěné na horních pólech ledvin. U savců se dělí na vnější kůru a vnitřní dřeň. Dřeň nadledvin syntetisuje katecholaminy. Kůra je dle složení buněk dělena do tří zón. Pod vazivovým pouzdem nadledvin se nachází zóna glomerulosa produkující mineralokortikoidní hormony (aldosteron), které regulují hospodaření s minerály v těle. Pod ní se nacházejí zóna fasciculata a zóna reticularis, které ve spolupráci produkují glukokortikoidy.

Prvním článkem HPA osy je hypothalamus. Podnětem k jeho aktivaci může být vliv cytokinů nebo zpětná vazba plasmatických glukokortikoidů. Výsledkem této aktivace je sekrece kortikotropin uvolňujícího hormonu (corticotropin releasing hormone, CRH), který pak stimuluje produkci adrenokortikotropního hormonu (adrenocorticotrophic hormone, ACTH) v hypofyze. ACTH se krevním řečištěm transportuje do kůry nadledvin, kde stimuluje produkci a sekreci glukokortikoidů. Sekretovaný glukokortikoid se v krvi vyskytuje v menší míře ve volné formě, ale hlavně ve formě vázané na proteiny. Vazba probíhá zejména s kortikoidy vázajícím globulinem neboli transkortinem (corticoid binding globulin, CBG) nebo sérovým albuminem. Ve vázané formě jsou pak glukokortikoidy distribuovány do cílových tkání. Kromě této byla v řadě tkání popsána extraadrenální biosynthesa glukokortikoidů buď přímo z cholesterolu, nebo z prekursorů.

Množství takto vzniklého glukokortikoidu je zanedbatelné v porovnání s celkovou produkcí organismem, může však významně parakrinně nebo autokrinně působit lokálně. Kortisol je u lidí produkován v porovnání s ostatními hormony ve vysokém množství (15 mg/den) [Cope, 1958; Esteban a kol., 1991], kortikosteron (2 mg/den) [Peterson a Pierce, 1960]. Přibližně 90% je navázáno na CBG a cirkuluje v krevním oběhu.

2.1.3 ÚČINKY GLUKOKORTIKOIDŮ

Hlavním úkolem endogenních glukokortikoidů je adaptace organismu na stresové podmínky. Tomuto účelu také odpovídá jejich sekrece. V nestresových podmínkách je u dospělých jedinců denně vylučováno 15-30 mg kortisolu. Sekrece se mění v závislosti na cirkadiálním rytmu a je řízena nepravidelným pulsním vyplavováním ACTH. Vrcholy jsou dosahovány v časných ranních hodinách a po jídlech. Ve stresových situacích se sekrece může zvýšit až 10x. Glukokortikoidy mají důležité účinky na metabolismus glukosy, tuků a bílkovin. Tyto účinky slouží již zmíněné základní úloze glukokortikoidů, kterou je zajištění dostatečného přísunu energie do životně důležitých tkání s preferencí mozku, a to zejména ve stresových situacích. Energie musí být ve formě okamžitě použitelné, tj. ve formě glukosy. Intenzita těchto účinků je závislá na mohutnosti sekrece endogenních glukokortikoidů.

Původní představa byla, že endogenní glukokortikoidy fungují jako „brzda“ v počáteční fázi imunitní odpovědi, aby zabránily jejímu případnému prudkému rozvoji, který by mohl být bez kontroly i smrtelný [Munck a kol., 1984]. Později bylo zjištěno, že nahlížet na glukokortikoidy jako na výhradní imunosupresiva je příliš zjednodušené. Glukokortikoidy výrazně ovlivňují metabolické a imunitní funkce, distribuci leukocytů, buněčnou diferenciaci a transkripci mnoha genů v glukokortikoid-senzitivních buňkách (monocytech, makrofázích, neutrofilech a granulocytech) [Ashwell a kol., 2000; McEwen a kol., 1997]. Dále také potlačují transkripci genů kódujících prozánětlivé mediátory - zejména cytokiny a jejich receptory - zatímco transkripci protizánětlivých cytokinů včetně IL-10 a IL-1 zvyšují [Barnes, 1998]. Mobilisují aminokyseliny z extrahepatálních tkání a stimulují glukoneogenesi [Kotelevtsev a kol., 1997]. Urychlují také lipolysu a snižují příjem glukosy ve svalové a tukové tkáni. Spolu s hormony dřeně nadledvin jsou důležitým prvkem při stresových reakcích organismu [Munck a kol., 1992].

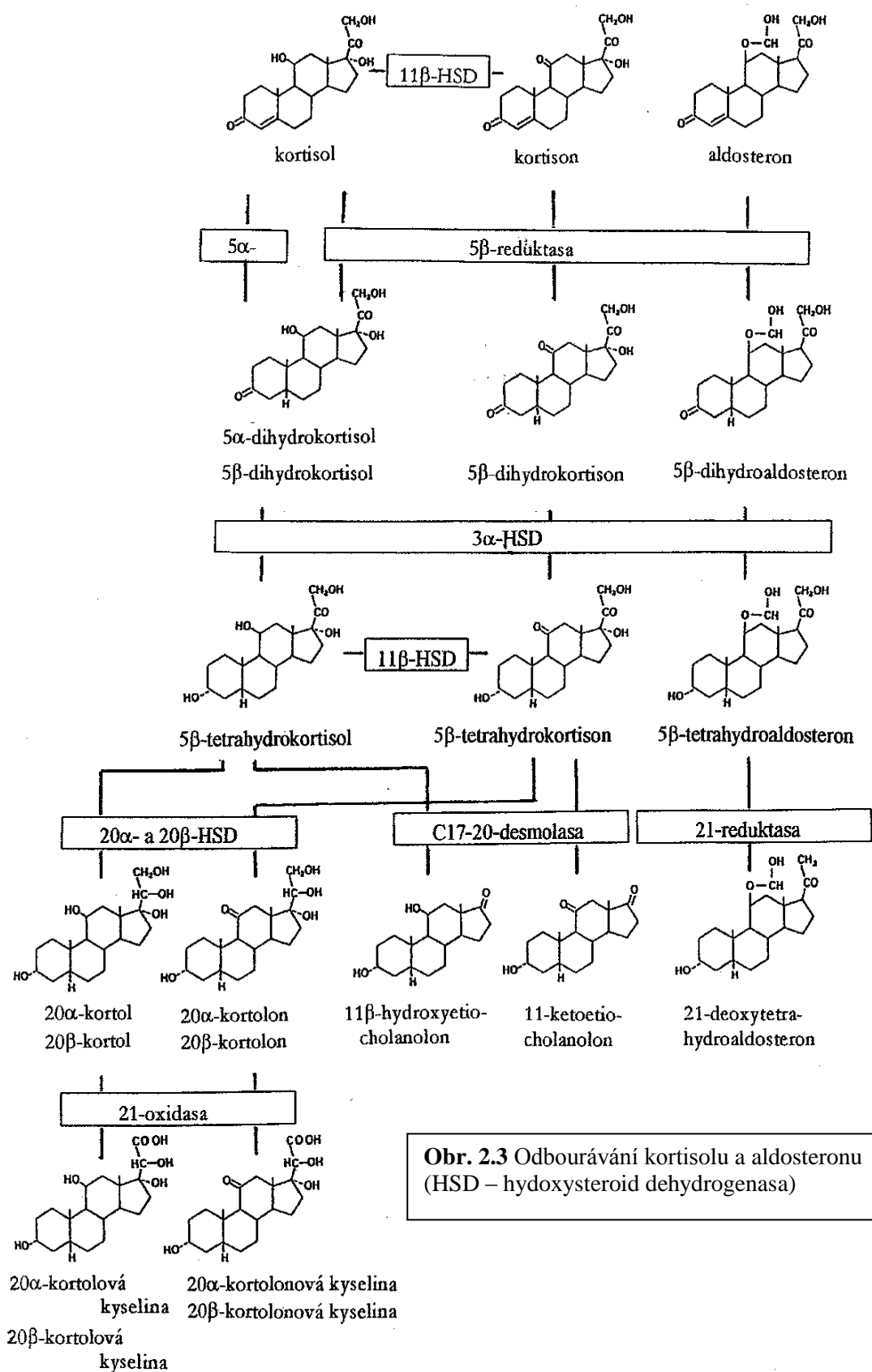
2.1.4 ODBOURÁVÁNÍ GLUKOKORTIKOIDŮ

Jednotlivé kroky odbourávání adrenálních hormonů zobrazuje obrázek 2.3 (str. 18)

Odbourávání glukokortikoidů lze rozdělit do několika fází:

1. konverze 11-hydroxyl sloučeniny (kortisolu) na 11-oxo sloučeninu (kortison) účinkem 11 β HSD (11 β -hydroxysteroiddehydrogenasy) [Monder a White, 1993]; metabolismus kortisolu i kortisonu poté probíhá po stejných drahách
2. redukce C4-5 dvojně vazby 5 β -reduktasou nebo 5 α -reduktasou za vzniku dihydrokortisolu nebo dihydrokortisonu a následnou hydroxylací C3 oxo skupiny za vzniku tetrahydrokortisolu nebo tetrahydrokortisonu [McGuire a kol., 1959]
3. tetrahydrokortisol a tetrahydrokortison mohou být konjugovány s glukuronátem a vyloučeny močí [Cope, 1972].
4. další redukci 20-oxo skupiny 20 α -hydroxysteroiddehydrogenasou (HSD) nebo 20 β -hydroxysteroiddehydrogenasou vzniknou z kortisonu (α , β) kortolony a z kortisolu (α , β) kortoly [Shackleton, 1993]
5. hydroxylace C6 na 6 β -hydroxykortisol
6. štěpení tetrahydrokortisolu a tetrahydrokortisonu na C19 steroidy
7. oxidace C21 kortolonů a kortolů za vzniku kortolonové a kortové kyseliny [Monder a Bradlow, 1980]

Ve formě tetrahydrokortisonu a tetrahydrokortisolu se vyloučí asi 50 % kortisolu a kortisonu, 25 % ve formě kortolů a kortolonů, 10 % ve formě C19 steroidů a 10 % jako kortolonové a kortové kyseliny. Zbytek metabolitů tvoří volné, nekonjugované steroidy (kortisol, kortison, 6 β - a 20 α /20 β - metabolity kortisolu a kortisonu) [Fukushima a kol., 1960].



Obr. 2.3 Odbourávání kortisolu a aldosteronu (HSD – hydroxysteroid dehydrogenasa)

2.2 PŮSOBENÍ GLUKOKORTIKOIDNÍCH HORMONŮ

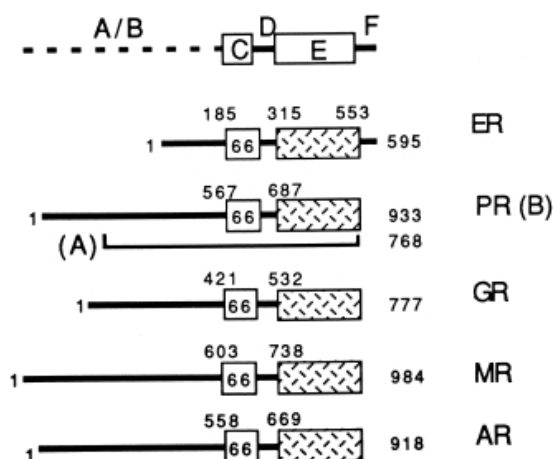
2.2.1 GENOMOVÉ PŮSOBENÍ

V souladu s běžně uznávanou teorií steroidy ovlivňují transkripci interakcí s intracelulárními (nukleárními) receptory, které pak působí jako transkripční faktory závislé na ligandech. Po navázání steroidu na receptor dojde k homo- či heterodimerizaci komplexu ligand - receptor, translokaci do jádra a následně k vazbě na palindromickou specifickou vazebnou doménu zvanou hormone response element (HRE). Poté je zahájena transkripce spojená s činností základních transkripčních komplexů, různých koaktivátorů, represorů a regulátorů transkripce [Beato a Klug, 2000]. Toto působení bylo nazváno „genomové“ vzhledem ke své senzitivitě k inhibitorům transkripce a translace. Expresi genů vyvolaná steroidy je modulována na proteinové úrovni několik hodin po stimulaci steroidy, ačkoliv některé brzké geny jsou vylučovány již jednu hodinu po stimulaci aldosteronem [Verrey, 1998]. Vazba ligandu na receptor a následné akce ovlivňují buněčné funkce tím, že modulují intracelulární signální dráhy „druhých posílů“ (second messengers systems, např. cAMP, cyklický adenosinmonofosfát) [Nordeen a kol., 1994]. Genomové působení steroidů reguluje expresi mnoha genů a spouští řetězce mnoha jevů, které jsou součástí téměř všech stránek vývoje obratlovců [Evans, 1988; Beato a kol., 1996; Beato a Klug, 2000].

2.2.1.1 Receptory genomového působení

Glukokortikoidy spouští svůj účinek v cílových tkáních navázáním na specifický receptor, který se nachází v cytoplasmě buňky, tzv. glukokortikoidní receptor (GR). GR byl první steroidní receptor, který byl popsán, prozkoumán a klonován [Hollenberg a kol., 1985]. Je známá jediná třída GR, která váže glukokortikoidy bez prokazatelného vlivu různé afinity v různých tkáních. Bylo ale objeveno několik variant, které vznikají jako důsledek odlišných posttranskripčních sestřihů a posttranslačních úprav. GR- α je složen ze 777 aminokyselin a váže glukokortikoidy. Na druhé straně GR- β je forma vzniklá při alternativním sestřihu, skládá se ze 742 aminokyselin a od GR- α se liší

posledními 115 - ti aminokyselinami. GR- β se váže na DNA, ale nemá schopnost vázat glukokortikoidy a proto tedy může potencionálně interferovat s glukokortikoidním účinkem [Bamberger a kol., 1995].



Obr. 2.4 Struktura lidských receptorů pro pohlavní a adrenální hormony. (Vrchní obrázek ukazuje šest funkčních domén: A/B, F - modulační domény; C - DNA-vazebná oblast; D - oblast spojující C a E domény; E - hormon - vázající region. Rámečky - vysoce konzervované domény; šrafované oblasti - regiony s nízkou homologií. Pozice okrajů domén je udána jako počet aminokyselin od amino konce (vlevo). Pro tyto receptory se C doména skládá z 66 aminokyselin. Receptory jsou pro estrogen (ER), progesteron (PR, A a B), glukokortikoidy (GR), mineralokortikoidy (MR) a androgen (AR).

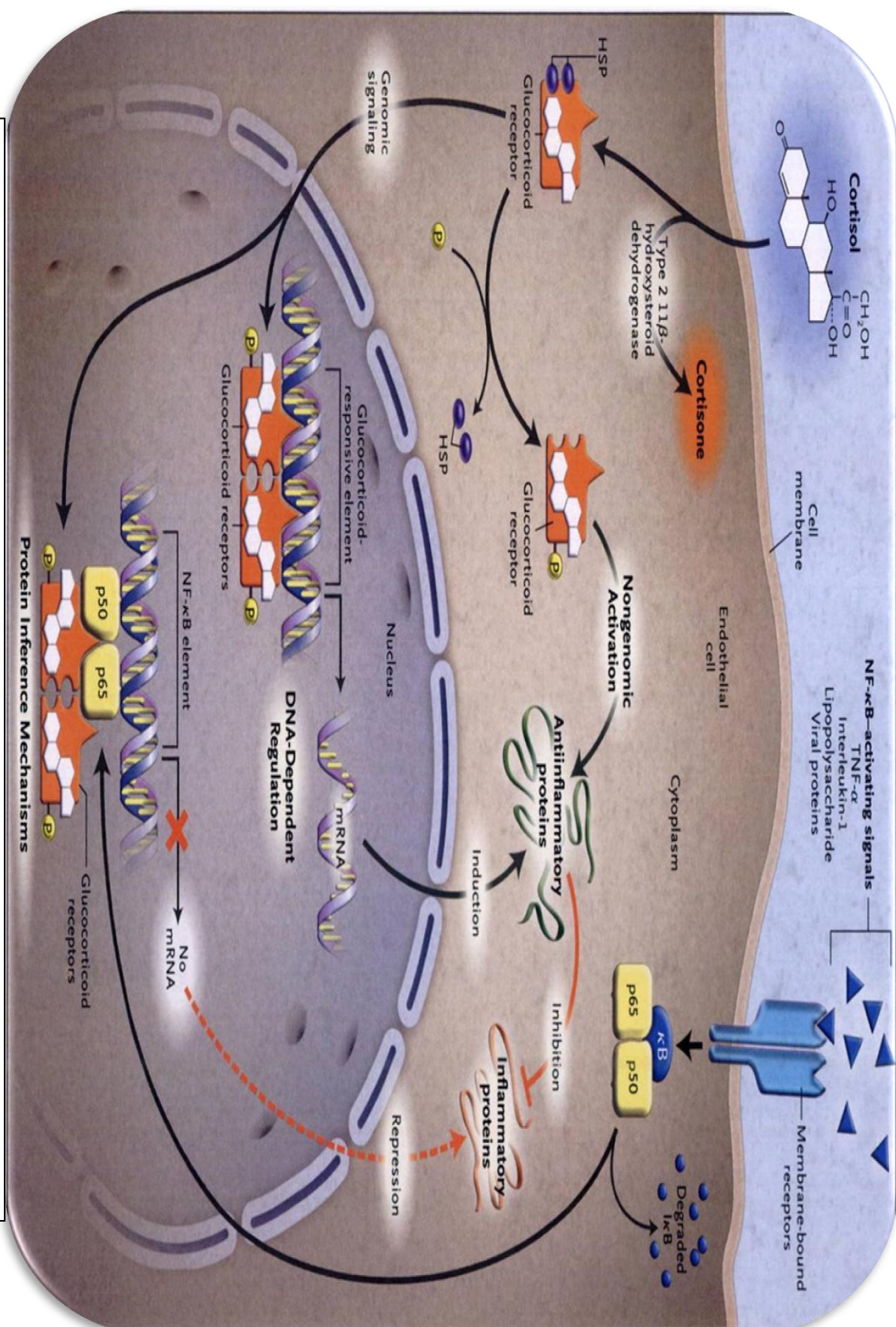
GR- β vykazuje velmi nízkou expresi ve srovnání s GR- α [Pujols a kol., 2002]. Následně po GR byly popsány a klonovány mineralokortikoidní receptor (MR) [Arizza a kol., 1987], receptor pro estradiol (ER) [Greene a kol., 1986; Krust a kol., 1986], progesteron (PR) [Loosfelt a kol., 1986; Misrahi a kol., 1987], androgeny (AR) [Chang a kol., 1988; Lubahn a kol., 1988] a vitamin D₃ (VDR) [McDonnell a kol., 1987]. Některé z těchto receptorů jsou zobrazeny na obrázku 2.4.

Struktura GR byla objasněna pomocí místně cílené mutagenese, která odhalila různé domény [Muller a kol., 1991]. Glukokortikoidy vázající doména (glucocorticoid-binding domain, GBD) se nachází na C-terminálním konci molekuly, uprostřed se nalézají dva zinkové prsty a pak následuje N-terminální doména (τ_1), která se účastní

trans-aktivace genů. Na cysteiny bohatá prostřední oblast je zodpovědná za vazbu na DNA (DNA-binding domain, DBD). V lidském GR se nalézá ještě jiná *trans*-aktivační doména (τ_2), sousedící s glukokortikoid vázající doménou. GR mohou být pozměněny fosforylací nebo jinými modifikacemi, které mohou měnit schopnost vázat glukokortikoidy; ovlivnění vazby ligandů, přemístění do jádra, účinnost *trans*-aktivace, interakce protein-protein nebo odčerpávání kofaktorů [Bodwell a kol., 1998; Ismaili a kol., 2004]. Například existuje velké množství serinových/threoninových zbytků na N-terminální doméně, na kterých může dojít k fosforylaci GR pomocí různých kinas.

2.2.1.2 Interakce hormon - receptor

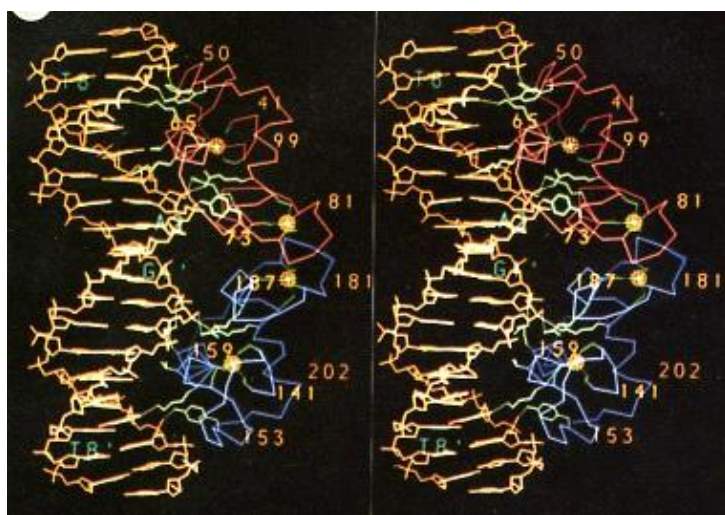
Předpokládá se, že lipofilní steroidní hormony se do cílových buněk dostávají pomocí prosté difuze, ačkoliv jsou zkoumány i teorie aktivního transmembránového transportu [Allera a Wildt, 1992]. Cytoplasmatické GR jsou za normálních okolností vázány na proteiny známé jako molekulární chaperony, které receptor chrání a zabraňují přemístění do jádra tím, že pokrývají ta místa na receptoru, která jsou potřebná pro průnik přes jadernou membránu do jádra [Wu a kol., 2004]. K těmto molekulárním chaperonům patří například 90kDa heat shock protein (hsp90) a 56kDa immunophilin (hsp56) udržující receptor v neaktivní formě s vysokou afinitou pro daný steroid [Pratt a Toft, 1997]. Po navázání glukokortikoidu na GR na hormon-vázající doméně vedou změny ve struktuře receptoru k disociaci těchto chaperonů a k dalším konformačním změnám, kterými se odkryje DNA-vazebná doména. To způsobí zvýšení afinity komplexu glukokortikoid-receptor k DNA a ke zmenšení velikosti tohoto komplexu. Následkem je rychlý transport aktivovaného GR-kortikosteroidního komplexu do jádra, kde se váže na DNA prostřednictvím specifické vazebné domény pro glukokortikoidy, nazývané se hormone-responsive element (HRE). Celý proces přenosu glukokortikoidního signálu (genomový i negenomový) zobrazuje obrázek 2.5 (str. 22).



Obr. 2.5 Genomový a nengenomový mechanismus účinku kortisolu (HSP – heat shock protein)

2.2.1.3 Interakce se specifickou vazebnou doménou

Po přenosu do jádra se komplex hormon - receptor váže na palindromickou sekvenci DNA. U receptorů pro glukokortikoidy, mineralokortikoidy, androgeny a progestiny probíhá se stejnou HRE, která byla původně popsána jako glucocorticoid response element (GRE). GRE se skládá ze dvou hexanukleotidů, jejichž sekvence jsou vzájemně zrcadlově převrácené a které jsou odděleny třemi libovolnými nukleotidy (5'-GGTACAnnnTGTTCT-3') [Beato, 1989]. Šestý pár basí na obou koncích palindromu není pevně definován a jeho identita není podstatná pro specifickou vazbu [Scheidereit a kol., 1983]. Na GRE se váží dvě aktivované molekuly GR jako homodimer (obrázek 2.6) a po připojení dalších regulačních faktorů se urychluje, resp. zpomaluje transkripce.

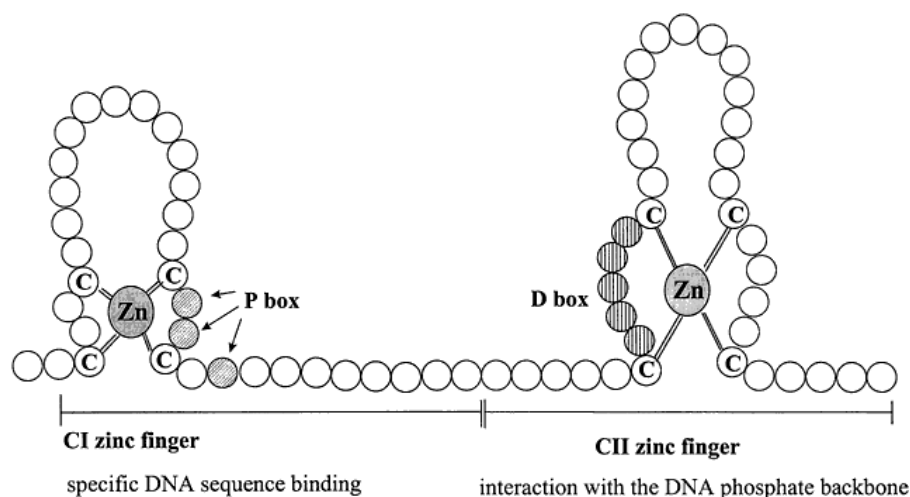


Obr. 2.6 Vazba GRE s GR (stereoskopický pohled na vazbu homodimeru glukokortikoidního receptoru, pravá část každého obrázku, na GRE, dvojité šroubovice DNA zobrazená žlutě v levé části obrázku).

Pro navázání receptoru je však třeba zpřístupnit HRE na DNA, který je ale zhuštěn v chromatin. Genetické analýzy prokázaly, že histony jsou důležitou součástí procesu regulace genů a určují, které geny budou transkripčně aktivní a u kterých bude naopak transkripce potlačena [Beato a Einfeld, 1997]. Některé koaktivátory (jako například CBP, cyclic AMP response element binding (CREB) binding protein) steroidních receptorů vykazují histon-acetyltransferasovou aktivitu. Acetylace lysinových residuí histonů

těmito koaktivátory může silně redukovat afinitu histonů k DNA a tím umožnit přístup steroidních receptorů k příslušnému HRE na DNA [Beato a Klug, 2000; Roth a kol., 2001]. Je možné, že sekvence nukleotidů v DNA a jejich na enzymech závislé sbalování chromatinu kontrolují přístup jednotlivých transkripčních faktorů k jejich cílovým vazebným místům na DNA [Beato a Eisefeld, 1997].

Interakce komplexu steroid - hormon s HRE je koordinována existencí zinkových prstů, které jsou specifické pro daný steroidní receptor [Beato, 1989]. Tento zinkový prst specifický pro steroidní receptor je tvořen čtyřmi cysteiny v DBD oblasti bohaté na cysteiny a několika aminokyselinami v oblasti přilehlé. Zatímco proximální zinkový prst (P-box) je zodpovědný za specifickou interakci s HRE, distální zinkový prst (D-box) vytváří slabou dimerizační oblast na DNA-vázající doméně (obrázek 2.7).



Obr. 2.7 Zinkové prsty steroidního receptoru

2.2.1.4 Iniciace transkripce indukovaná glukokortikoidy

Množství genů na buňku přímo regulované kortikosteroidy je odhadováno minimálně na 10 až 100, ale mnoho genů je regulováno i nepřímo pomocí interakce s jinými transkripčními faktory a koaktivátory. Interakce GR s GRE obvykle vede ke zvýšení transkripce genu (*trans*-aktivace), ale byly již popsány i opačné situace, kdy se GR navázal na negativní GRE, což vedlo k potlačení transkripce genu (*cis*-represe) [Dostert a kol., 2004]. Aktivace genů kortikosteroidy je asociována se selektivní acetylací

lyzinových reziduí 5 a 16 na histonu H4, která vede ke zvýšení transkripce genů [Ito a kol., 2000; Ito a kol., 2001]. V jádře komplex steroid - receptor rovněž reaguje s koaktivátory transkripce, jako je CBP (CREB binding protein), které jsou aktivovány prozánětlivými transkripčními faktory, např. nukleární faktor κ B (nuclear factor κ B, NF- κ B), a tím dochází k potlačení transkripce genů, které jsou těmito transkripčními faktory aktivovány [Yao a kol., 1996; Kurihara a kol., 2002]. Nejlépe popsány koaktivátory steroidy indukované transkripce jsou koaktivátor steroidního receptoru 1 (steroid receptor coactivator 1, SRC-1) [Onate a kol., 1995] nebo již zmiňovaný CBP [Kamei a kol., 1996].

2.2.1.5 Alternativní účinky komplexu ligand - receptor (včetně netranskripčních)

Glukokortikoidy mohou také ovlivňovat expresi genů díky interakci nukleárních receptorů s transkripčními faktory se specifickou sekvencí. Například je známo, že glukokortikoidy mají vliv na aktivitu NF- κ B, což je významný modulátor cytokiny indukovaného zánětu. Glukokortikoidy zvyšují úroveň exprese inhibitoru I κ B, čímž je NF- κ B zachycen v cytoplasmě [Auphan a kol., 1995; Scheinman a kol., 1995]. Navíc GR interagují s p65, transkripčně aktivní podjednotkou NF- κ B, interakcí protein-protein [Ray a Prefontaine, 1994]. Všechna tato působení se nazývají netranskripční aktivity klasického steroidního receptoru.

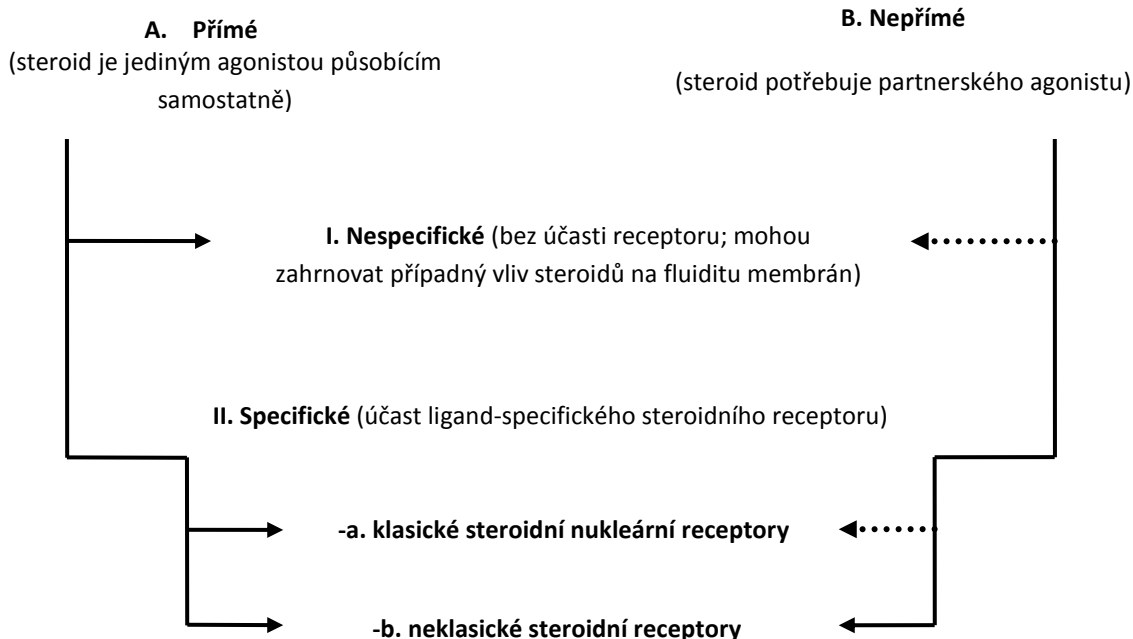
Dále bylo zjištěno, že kortikosteroidy mohou modulovat syntesu proteinů snižováním stability mRNA, díky čemuž je ve výsledku produkováno méně proteinu. Některé zánětlivé proteiny jsou regulovány posttranskripčně na úrovni stability mRNA [Anderson a kol., 2004]. Kortikosteroidy mohou mít inhibiční efekt na proteiny, které stabilizují RNA, což vede k jejímu rychlejšímu zhroucení a tím i ke snížení exprese zánětlivých proteinů [Bergmann a kol., 2000; Newton a kol., 2001]. Toto by mohl být významný protizánětlivý mechanismus vzhledem k tomu, že umožňuje glukokortikoidům vypnout probíhající produkci zánětlivých proteinů poté, co již byly aktivovány zánětlivé geny.

2.2.2 NEGENOMOVÉ PŮSOBNÍ

Hlavní glukokortikoidní účinek je zprostředkováván „klasickými“ steroidními receptory, které jsou umístěny v cytosolu a v jádře, a má vliv na genetickou informaci. Odezva organismu v tomto případě nastává v řádu hodin či dokonce dní. V roce 1963 ale Klein a Henk demonstrovali rychlý kardiovaskulární účinek aldosteronu na člověka, kdy se působení léku projevilo do pěti minut po podání [Klein a Henk, 1963]. Tento pokus jasně prokázal existenci negenomových signálních drah steroidů, které ke svému účinku využívají buď membránové receptory, „klasické“ glukokortikoidní receptory, nebo působí bez vazby na receptor. Membránové receptory byly objeveny v mnoha různých typech tkání, např. v buňkách mozkové tkáně [Orchinik a kol., 1991], v lymfocytech [Wehling, 1997], v ledvině [Vilella a kol., 1992] a ve střevě [Doolan a kol., 2000].

Mechanismy účinku negenomových přenosů, s přihlédnutím k odlišnostem vyplývajícím z rozdílného typu buněk a studovaného steroidu, jsou mnohdy zprostředkovány aktivací systémů druhotných pomocných transportních proteinů (second-messenger system), změnami iontového fluxu a aktivací různých kinasových signálních drah. Negenomové signální dráhy lze rozdělit do několika kategorií (Mannheimská klasifikace, obrázek 2.8; str. 27).

Schéma je rozděleno do dvou hlavních částí označených A (přímý steroidní účinek) a B (nepřímý steroidní účinek), které se dále dělí na specifickou (II) a nespecifickou (I) kategorii. Následuje další dělení na skupinu a (účast „klasického“ steroidního receptoru) a b (účast „neklasického“ steroidního receptoru). Kategorie BI a BIIa zatím nejsou dostatečně prozkoumány a jedná se prozatím jen o hypotetické kategorie [Falkenstein a kol., 2000].



Obr 2.8 Mannheimská klasifikace nengenomových steroidních účinků (šipky značené plnou čarou ukazují kategorie, jejichž existence je již prozkoumána a některé příklady jsou uvedeny v textu; tečkované šipky ukazují hypotetické kategorie, jejichž příklady zatím nejsou známy).

2.2.2.5 Rychlé účinky (rapid effects) glukokortikoidů

Již dříve bylo popsáno, že steroidní hormony, produkované nadledvinami jako odpověď na stresové situace, kromě dlouhodobého účinku také rychle moduluji funkce a chování mozku, stejně jako buněčné odpovědi vůbec [Orchinik a kol., 1994; Haller a kol., 1998]. Neurofysiologické a behaviorální účinky kortikosteronu byly intenzivně zkoumány u tarichy zrnité (*Taricha granulosa*) [Rose a Moore, 1999]. V tomto organismu byly změny v elektrofysiologické dráždivosti a schopnosti reagovat na podněty neuronů zadního mozku patrné již po 3 až 8 minutách po vstříku kortikosteronu (32nM) [Rose a kol., 1993]. Podobné rapidní účinky glukokortikoidů na systémové řízení neurální aktivity byly popsány v hypothalamu různých savců včetně krys, koček a králíků [Feldman a Dafny, 1970; Filaretov, 1976; Avanzino a kol., 1984]. Bylo také zjištěno, že kortikosteron rychle působí jako inhibitor uvolňování arginin - vasopresinu v řezech

hypothalamu u krys [Liu a kol., 1995]. Protože arginin - vasopresin sehrává důležitou úlohu v regulaci aktivity HPA osy, předpokládá se, že rychlé glukokortikoidní účinky mohou být do tohoto řízení rovněž zahrnuty. Výše popsané rychlé účinky byly již popsány u různých živočišných druhů, jako je například krysa [Sandi a kol., 1996], strnavec bělokorunkatý [Breuner a kol., 1998] či již zmiňovaná taricha zrnitá [Orchinik a kol., 1991, Rose a Moore, 1999].

2.2.2.6 Glukokortikoidní receptory pro rychlé účinky (rapid effects)

Vzhledem k výše popsaným účinkům glukokortikoidů na tarichu zrnitou je důležité poznamenat, že v tomto zvířeti byl pro tyto identifikován a charakterizován membránový receptor [Moore a Orchinik, 1994; Moore a kol., 1995]. Experimenty s ^3H -značeným kortikosteronem prokázaly přítomnost membránového vazebného místa s vysokou afinitou a s K_d 0,51 nM [Orchinik a kol., 1991]. Tento membránový receptor vykazuje podobné chování jako receptory spřažené s G-proteinem [Orchinik a kol., 1992]. Tento vazebný protein (receptor) byl u obojživelníků popsán jako kyselý glykoprotein s molekulovou hmotností 63 kDa [Evans a kol., 2000]. Bylo zjištěno, že membránový protein je vysoce specifický pro kortikosteron a kortisol. Steroidy s vysokou afinitou ke GR, jako aldosteron a dexametason, nevykazují vysokou afinitu také k tomuto membránovému kortikosteron-vazebnému místu [Orchinik a kol., 1991]. Protože jsou všechny charakteristiky tohoto membránového proteinu nesouhlasné s GR, jeví se jako pravděpodobné, že se jedná o dva různé receptorové proteiny [Evans a kol., 2000].

Kromě tohoto membránového místa popsaného u obojživelníků byla nalezena také podtřída GR vázaná v plasmatické membráně, tzv. mGR [Gametchu a kol., 1999]. S použitím protilátek pro GR byl detekován GR-připomínající antigen v membránách lymfomových buněk S-49 myši [Gametchu a kol., 1991] a krysích jater [Grote a kol., 1993]. Studie odhalily některé odlišnosti mezi mGR a GR, a to vzhledem k umístění v buňce, molekulové hmotnosti a poněkud odlišné specifitě pro steroidy. Scatchardova analýza pro dexametason odhalila hodnotu $K_d=239$ nM pro mGR a hodnotu $K_d=19,5$ nM pro GR [Powell a kol., 1999]. Na druhé straně byly objeveny také podobnosti obou proteinů. Například oba, mGR i GR, váží stejnou třídu steroidů, GRE na DNA a stejné heat shock proteiny a oba mohou být fosforylovány [Gametchu a kol., 1999]. To vedlo

k domněnce, že mGR je modifikovaná forma GR. Membránová vazebná místa pro kortisol byla nalezena v kuřecích, myších a krysích játrech [Trueba a kol., 1987; 1989; Ibarrola a kol., 1996]. Membránová vazebná místa pro kortikosteron byla dále nalezena v myši [Trueba a kol., 1989], v krysích játrech, ledvině a mozku [Trueba a kol., 1991; Ibarrola a kol., 1991; Guo a kol., 1995].

2.3 STEROIDNÍ DEHYDROGENASY

Dehydrogenasy steroidů patří jedné ze dvou odlišných skupin, alkoholdehydrogenas/reduktas nebo do aldo-keto reduktas, z nichž k nejlépe prostudovaným patří rodina dehydrogenas/reduktas s krátkým řetězcem (short chain dehydrogenase/reductase family, SDR). Další skupiny, ke kterým steroidní dehydrogenasy náleží, jsou například železo obsahující dehydrogenasy [Walter a kol., 1992], aldoketoreduktasy [Bohren a kol., 1989] a dehydrogenasy/reduktasy se středně dlouhým řetězcem [Nordling a kol., 2002]. Struktura SDR dehydrogenas je tvořena 250-300 aminokyselinami (klasická rodina) s N-terminální kofaktor-vázající doménou a s aktivním místem v střední části. Byly již ale popsány i enzymy, které mají přes 400 aminokyselin (rozšířená rodina), ale stále náleží do SDR rodiny [Jörnvall a kol., 1995]. V této rodině se vyskytuje pouze 15 - 30 % aminokyselinové sekvenční homologie [Jörnvall a kol., 1995], ale všichni známí členové této rodiny mají v aktivním místě konzervovaný tyrosin [Duax a Ghosh, 1998]. V současné době je známo okolo 3000 členů této rodiny a jedním z nich je i 11 β -hydroxysteroiddehydrogenasa.

2.3.1 11 β -HYDROXYSTEROIDDEHYDROGENASA

První zájem o aktivitu této dehydrogenasy byl spojen s objevem kortisonu. Hench, Kendall a Reichstein byli oceněni Nobelovou cenou za objev glukokortikoidu kortisonu v padesátých letech 20. století [Kendall, 1971]. Studie Copea a Blacka ukázaly, že biologická aktivita jakéhokoliv glukokortikoidu je spojena s přítomností hydroxylové skupiny na pozici C11 steroidního skeletu, a že přeměna této skupiny na oxo skupinu inaktivuje steroid [Cope a Black, 1958]. Kortisol a hlavní glukokortikoid hlodavců,

kortikosteron, jsou tedy aktivní steroidy, zatímco kortison a u hlodavců 11-dehydrokortikosteron jsou formy inaktivní, mající na C11 keto skupinu. Enzymatická konverze kortisonu na kortisol pomocí 11 β -hydroxysteroiddehydrogenasy byla popsána již v roce 1953 [Amelung a kol., 1953].

11 β -hydroxysteroiddehydrogenasa (EC 1.1.1.146, 11 β -hydroxysteroid: NAD(P⁺)-11-oxireduktasa, 11 β HSD) byla poprvé nalezena v játrech [Bush, 1969], placentě [Osinski, 1960] a ledvinách [Jenkins, 1966]. Patří do rodiny SDR dehydrogenas. Tento enzym zajišťuje přeměnu aktivní formy glukokortikoidu na jejich neaktivní 11-oxoderiváty a naopak. Enzym vykazuje jak 11-oxidasovou, tak 11-reduktasovou aktivitu. O směru reakce rozhoduje druh a koncentrace kofaktoru. Pokud převládá 11-oxidasová aktivita (NAD(P⁺)), bude lokálně snížena koncentrace aktivního glukokortikoidu, v případě převládající 11-reduktasové aktivity (NADH(PH)) bude koncentrace aktivního glukokortikoidu lokálně zvýšena.

Bylo ovšem zjištěno, že enzym vykazuje v různých tkáních převažující buď oxidasovou nebo reduktasovou aktivitu. V placentě a ledvinách působí zejména jako oxidasa [Whitworth a kol., 1989], kdežto v játrech jako reduktasa [Walker a kol., 1992]. Tím bylo prokázáno, že existují dva různé typy 11 β HSD, které se liší strukturou, lokalizací a funkcí [Albiston a kol., 1994; Tannin a kol., 1991]. Převážně reduktivní NADP(H)-dependentní typ 1 (11 β -hydroxysteroiddehydrogenasa 1, 11 β HSD1) nebo také „jaterní“ izozym (typ L) a oxidativní NAD-dependentní typ 2 (11 β -hydroxysteroiddehydrogenasa 2, 11 β HSD2) nebo „ledvinový“ izozym (typ K). Ačkoliv oba typy enzymu náleží k SDS rodině, sdílejí pouze 21 % homologie. Vysokoafinitní forma 11 β HSD2 (K_m = 56,3 \pm 2,2) byla lokalizována na povrchu epithelu a krypt, naproti tomu výskyt mRNA pro enzym 11 β HSD1 (K_m = 0,95 \pm 0,14) byl omezen na specifické buňky lamina propria mucosae¹ [Whorwood a kol., 1994]. Tato skutečnost byla potvrzena zkoumáním 11 β HSD1 ve fibroblastech [Hammami a kol., 1991], makrofázích [Thieringer a kol., 2001] a lymfatických buňkách [Hennebold a kol., 1996].

¹ Lamina propria mucosae je tenká vrstva pojivového vaziva, která se nachází pod epitelem, ve spolupráci s nímž vytváří mukosu. V tenkém střevu obsahuje kapiláry a mizní cévy. Rovněž obsahuje kanálky vybíhající na povrch slizničního epithelu, jimiž se sekretuje mukosa.

Oba enzymy jsou odvozeny od samostatných genových produktů [Tannin a kol., 1991, Albiston a kol., 1994]. Podobnosti a rozdíly obou enzymů jsou shrnuty v Tabulce 1.

Tabulka 1 Srovnání charakteristik 11 β HSD typu 1 a 2

	11 β HSD1	11 β HSD2
Enzymová kinetika	<i>in vitro</i> obousměrný, <i>in vivo</i> převážně reductasa nízká substrátová afinita (K_m - μ mol/l) kofaktor NADP/H	dehydrogenasová aktivita pro endogenní steroidy vysoká substrátová afinita (K_m - nmol/l) kofaktor NAD ⁺
Vysoká exprese	játra, plíce, vaječníky, hypofýza, mozek	ledvina, střevo, slinné žlázy, placenta
Molekulární biologie	chromozom 1 gen: délka 9kb, šest exonů enzym: 292 aminokyselin, 34 kDa pouze 14 % homologie s 11 β HSD2	chromozom 16 gen: délka 6,2 kb, pět exonů enzym: 405 aminokyselin, 40 kDa 35 % homologie s 17 β HSD/KSR2
Funkce <i>in vivo</i>	úprava intracelulární koncentrace GC, orgánově-specifické zvýšení GC účinku	ochrana MR před kortisolem a kortikosteronem

KSR = ketosteroidní reductasa, GC - glukokortikoid

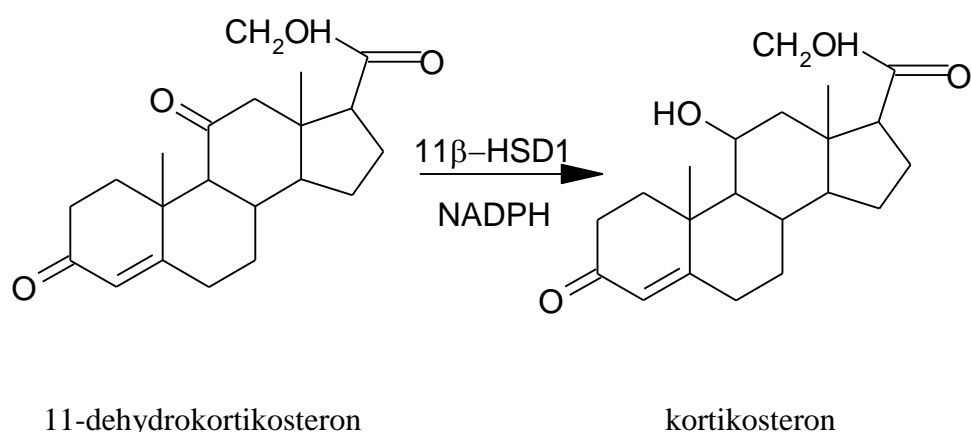
2.3.1.1 11 β -hydroxysteroiddehydrogenasa 1

11 β HSD1 je NADP/NADPH dependentní glykoprotein (34kDa). V aktivním stavu se vyskytuje jako homodimer s jednou membránovou doménou. Její K_m *in vitro* je více než o řád vyšší než u 11 β HSD2. Protein se skládá z 287 aminokyselin [Monder a Lakshmi, 1989; Agarwal a kol. 1989], ačkoliv sekvence cDNA byla následně doplněna o nové informace v roce 2002 [Nobel a kol., 2002].

Tento enzym byl nalezen ve velkém množství tkání, jako například v játrech [Ricketts a kol., 1998], varlatech [Monder a kol. 1994], vaječnících [Stewart a kol., 1995; Sun a kol., 1997] či plicích [Hirasawa a kol., 1999]. V klasických mineralokortikoidních cílových tkáních, jako jsou ledviny, slinné žlázy a distální střevo, je exprese 11 β HSD1 genu nízká [Whorwood a kol., 1995]. Na rozdíl od toho vysoká exprese 11 β HSD1 genu je v klasických glukokortikoidních tkáních, k nimž patří játra, tuková tkáň nebo pohlavní žlázy [Tannin a kol., 1991]. Izolace a klonování cDNA 11 β HSD1 a proteinu proběhla u člověka [Tannin a kol., 1991], myši [Rajan a kol., 1995], kotula [Moore a kol., 1993], ovce [Yang a kol., 1992], králíka [Ozols, 1995], prasete [Klemcke a kol., 2003], krávy

[Tetsuka a kol., 2003] a morčete [Pu a Yang, 2000; Shafqat a kol., 2003]. 11 β HSD1 z lidských jater byla purifikována v aktivní formě a bylo postulováno, že existuje ve formě dimeru [Maser a kol., 2002]. Maser a kol. [2002, 2003] objevili neobvyklou kinetiku mechanismu účinku 11 β HSD1 v lidských játrech. Stanovili, že tento enzym se řídí kinetikou Michaelis-Mentenové ve vztahu ke kortisolu, ale odlišnou kinetikou u kortisonu. V takovém případě může 11 β HSD1 pracovat jak při nanomolárních, tak při mikromolárních koncentracích substrátu.

Enzym vykazuje obousměrnou aktivitu (redukci a oxidaci) *in vitro*, ale *in vivo* se jeví pouze jako reduktasa konvertující neaktivní 11-dehydroglukokortikoid (11-dehydrokortikosteron či kortison) na jeho aktivní formu 11-hydroxykortikoid (kortikosteron či kortisol) s NADPH jako kosubstrátem [Jamieson a kol., 1995; Low a kol., 1994] (obrázek 2.8).



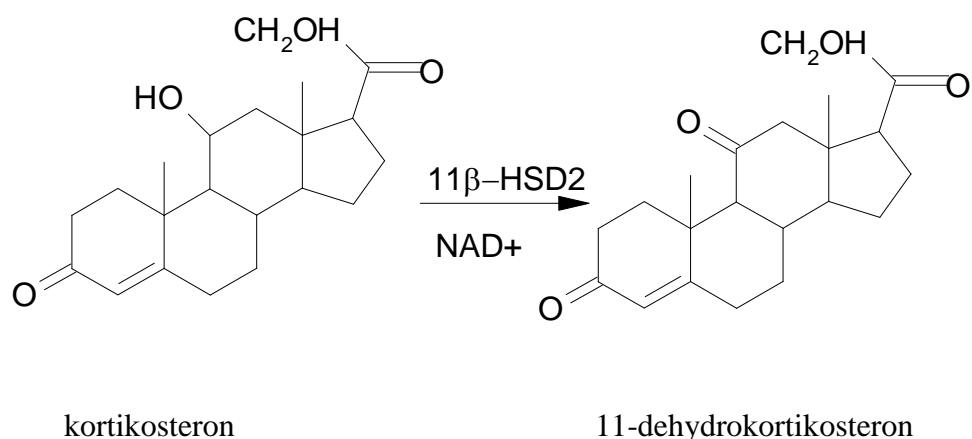
Obr. 2.8 Konverze biologicky neaktivního hormonu na aktivní pomocí 11 β HSD1

Toto jednosměrné působení *in vivo* vede k lokálnímu zvýšení koncentrace biologicky aktivních glukokortikoidů v buňkách exprimujících 11 β HSD1. Toto souvisí s typem tkáně, fosforylací enzymu nebo dostupností kofaktoru. Bylo zjištěno, že v endoplasmatickém retikulu mohou být sousední enzymy silnými zdroji kosubstrátu NADPH pro 11 β HSD1. Jedním z těchto enzymů je hexosa-6-fosfátdehydrogenasa (H6PDH). Ta produkuje NADPH pomocí oxidace různých hexos-6-fosfátů (včetně glukosy-6-fosfátu) a tím zajišťuje zásobení 11 β HSD1 NADPH, čímž reguluje její aktivitu. *In vivo* tedy bude upřednostněna NADPH redukce.

2.3.1.2 11 β -hydroxysteroiddehydrogenasa 2

V aktivním stavu je to monomer o velikosti 40 kDa, *in vivo* tvoří také dimer o 80kDa, ovšem bez biologické aktivity. Tento izozym má vysokou afinitu ke kortisolu s K_m 50 nM (100krát vyšší než 11 β HSD1) a 5 nM pro kortikosteron [Brown a kol., 1993; Albiston a kol., 1994; Stewart a kol., 1994]. Izolace a klonování cDNA 11 β HSD2 proběhla z ledvin člověka [Albiston a kol., 1994], ovce [Agarwal a kol., 1994], králíka [Naray-Fejes-Tóth a Fejes-Tóth, 1995] a myši [Condon a kol., 1997]. Celý protein obsahuje asi 405 aminokyselin. Nachází se na endoplasmatickém retikulu, ve kterém má 3 transmembránové domény. Katalytická doména směřuje do cytosolu a N-terminální do endoplasmatického retikula. Gen kódující 11 β HSD2 je přibližně 6,2 kb dlouhý a má 5 exonů.

Enzym je produkován ve velké míře mineralokortikoidními cílovými tkáněmi [Edwards a kol., 1988], jako jsou ledviny [Agarwal a kol., 1994, Albiston a kol., 1994, Stewart a kol., 1994] či střevo [Whorwood a kol., 1994]. Exprese byla rovněž pozorována v epitheliálních buňkách slinných žláz [Roland a Funder, 1996], lidské kůži [Kenouch a kol., 1994] nebo v placentě [Sun a kol., 1997; Krozowski a kol., 1995]. Schopnost 11 β HSD2 inaktivovat glukokortikoidy je v placentě velmi silná, což je podpořeno tím, že placenta je nejbohatší zdroj tohoto enzymu na miligram mokré váhy tkáně [Shams a kol., 1998]. Bylo prokázáno, že exprese obou enzymů 11 β HSD, 11 β HSD1 i 11 β HSD2, ledvinou je druhově specifická. V krysích ledvinách, v proximálních tubulech, byla naměřena vysoká hladina 11 β HSD1 mRNA [Agarwal a kol., 1989], zatímco v lidské a ovčí ledvině je úroveň 11 β HSD1 mRNA sotva měřitelná [Tannin a kol., 1991; Yang a kol., 1992].



Obr. 2.9 Inaktivace kortikosteronu pomocí 11 β HSD2

Enzym 11 β HSD2 vykazuje řádově nižší K_m , jako kofaktor využívá NAD^+ a pracuje pouze jako dehydrogenasa, tj. snižuje ve tkáních lokální koncentraci glukokortikoidů (obrázek 2.9). Díky této své vlastnosti brání 11 β HSD2 navázání biologicky účinných glukokortikoidů (kortisol, kortikosteron) na mineralokortikoidní receptory a tím jej chrání. To má velký fyziologický význam, neboť MR vykazují téměř stejnou afinitu ke kortisolu (kortikosteronu) i aldosteronu, tzv. “paradox mineralokortikoidních receptorů” [Krozowski a Funder, 1983; Arriza a kol., 1987]. Purifikovaný mineralokortikoidní receptor váže *in vitro* jak aldosteron, tak kortikosteron s vysokou afinitou okolo 0,5-1 nM [Arriza a kol., 1987]. Za podmínek *in vivo* však MR váže pouze aldosteron. Působením 11 β HSD2 se glukokortikoidy konvertují na 11-oxo deriváty s nižší afinitou k MR. Specifita MR není dána samotným receptorem, nýbrž účinkem 11 β HSD.

2.4 REGULACE ZÁNĚTU

Glukokortikoidy mohou kontrolovat zánět blokováním mnoha aspektů zánětlivého procesu zvyšováním transkripce protizánětlivých genů a naopak snižováním genů prozánětlivých. Příklady některých efektů glukokortikoidů na transkripci různých genů významných pro zánětlivé procesy jsou uvedeny v Tabulce 2 (str. 36). Glukokortikoidy zvyšují syntézu lipokortinu-1, 37 kDa proteinu, majícího inhibiční efekt na fosfolipasu A_2 (PLA_2), a tak mohou inhibovat produkci lipidových mediátorů. Tvorba lipokortinu-1

je indukována v různých buňkách a rekombinantní lipokortin-1 má výrazné protizánětlivé vlastnosti [Flower a Rothwell, 1994]. Antagonista receptoru interleukinu IL-1 je cytokin², který blokuje vazbu interleukinu-1 na jeho receptor. Glukokortikoidy zvyšují jeho produkci, čímž působí proti prozánětlivému efektu cytokinu IL-1. Proto léčba astmatických pacientů inhalováním glukokortikoidů vede ke zvýšení exprese antagonisty receptoru IL-1 v epitheliálních buňkách dýchacích cest *in vitro* a *in vivo* [Levine a kol., 1996; Sousa a kol., 1996]. IL-1 interaguje se dvěma typy povrchových receptorů, označovaných jako IL-1R1 a IL-1R2. Zánětlivé působení IL-1 β je zprostředkováno výhradně IL-1R1, kdežto IL-1R2 nevykazuje žádnou signalizační aktivitu, váže ale IL-1, a tím působí jako „molekulární návnada“, která interferuje s účinkem IL-1. Glukokortikoidy podporují tento proces, což vede k redukci funkční aktivity IL-1 [Colotta a Muzio, 1993]. NF- κ B je regulován inhibičním proteinem I κ B, ke kterému je vázán v cytoplasmě [Barnes a Karin, 1997]. NF- κ B je transkripční faktor aktivující imonuregulační geny, jehož základní forma je heterodimer složený z podjednotek p50 a p65 [Grilli a kol., 1993]. V nestimulovaných buňkách je tento heterodimer uchováván jako neaktivní komplex v cytoplasmě pomocí inhibičních proteinů I κ B α a I κ B β [Baeuerle a Baltimore, 1988]. Po stimulaci buňky jsou I κ B α a I κ B β rychle degradovány a uvolněný dimer NF- κ B se přesouvá do jádra, kde aktivuje cílové geny [Grilli a kol., 1993; Beg a Baldwin, 1993]. Tento proces je přechodný a je ukončen indukcí I κ B α s účastí NF- κ B jako mediátoru [Beg a Baldwin, 1993; Sun a kol., 1993]. Glukokortikoidy působí jako účinné inhibitory aktivace NF- κ B a tato inhibice je důsledkem indukce exprese I κ B α [Auphan a kol., 1995].

² Cytokiny: Malé proteiny, které modulují a regulují imunitu, zánět a hematopoesu. Jsou produkovány *de novo* jako odpověď na imunitní stimul. Zpravidla (avšak ne vždy) působí na krátké vzdálenosti, v krátkých časových intervalech a ve velmi nízkých koncentracích. Působí pomocí vazby na specifické membránové receptory, které poté přenášejí signál do buňky za účasti kaskády druhých posílů, obvykle tyrosinkinas. Cytokinové působení zahrnuje zvyšování nebo snižování exprese membránových proteinů (včetně cytokinových receptorů), proliferaci a sekreci efektorových molekul. Cytokiny se dále dělí dle buněk, které je produkují, a způsobu účinku na lymfokiny (cytokiny tvořené lymfocyty), monokiny (cytokiny tvořené monocyty), chemokiny (cytokiny s chemotaktickým působením) a interleukiny (cytokiny tvořené jedním leukocytem a působící na leukocyt jiný). Cytokiny mohou působit na buňky, které je produkují (autokrinní působení), na okolní buňky (parakrinní působení) nebo na buňky vzdálené (endokrinní působení).

Tabulka 2 Účinky glukokortikoidů na transkripci genů

Zvýšení transkripce (<i>trans</i> -aktivace)	Snížení transkripce (<i>trans</i> -represe)
Lipokortin 1 (inhibitor fosfolipasy A ₂)	Cytokiny
IL-1R2	IL-1 až IL-6, IL-9, IL-11 až IL-13, IL-16
Antagonista receptoru IL-1	až IL-18, TNF- α , GM-CSF, SCF
CC10 (inhibitor fosfolipasy A ₂)	Chemokiny
MKP-1	IL-8, MCP-1, MCP-3, MCP-4
I κ B α	Zánětlivé enzymy
IL-10 (nepřímě)	iNOS, cPLA ₂ , COX-2

2.4.1 ÚLOHA 11 β -HYDROXYSTEROIDDEHYDROGENAS

Existuje mnoho důkazů, že prozánětlivé cytokiny (TNF- α , IL-1 β) indukují expresi a aktivitu 11 β HSD1 v širokém spektru buněk a tkání, ale na druhou stranu snižují expresi a aktivitu 11 β HSD2. V mesangiálních buňkách dochází vlivem prozánětlivých cytokinů TNF- α a IL-1 β ke zvýšení aktivity 11 β HSD1 [Escher a kol., 1997]. Podobně TNF- α a IL-1 β *in vitro* zvyšují expresi 11 β HSD1 v primární kultuře lidských preadipocytů [Tomlinson a kol., 2001]. Povrchové epitheliální buňky vaječníků exprimují 11 β HSD1 a tato exprese může být rovněž zvýšena účinkem IL-1 [Yong a kol., 2002]. V průběhu ovulace granulosaové buňky produkují enzym 11 β HSD2, který chrání folikul před účinky steroidů. Během luteinizační fáze dojde k prasknutí folikulu a granulosaové buňky zahájí účinkem IL-1 β expresi 11 β HSD1 namísto 11 β HSD2. Zvýšení exprese a aktivity 11 β HSD1 účinkem prozánětlivých mediátorů ve vaječnících může tedy sloužit k minimalizování poškození tkáně zánětem po ovulační ruptuře. Podobná regulace 11 β HSD1 a 11 β HSD2 byla popsána v lidské osteosarkomové linii buněk MG-63 [Cooper a kol., 2001] a lidských aortálních buňkách hladké svaloviny [Cai a kol., 2001]. Inkubací monocytů s IL-4 a IL-13 lze zvýšit aktivitu 11 β HSD1 až desetinásobně a tento efekt je možné potlačit IFN- γ , což je funkční antagonist těchto interleukinů [Thieringer a kol., 2001].

Lze předpokládat, že prozánětlivé cytokiny (TNF- α , IL-1 β) ve velké míře snižují aktivitu 11 β HSD2, což je spojeno se vzrůstem aktivity 11 β HSD1 v různých typech buněk [Cai a kol., 2001; Cooper a kol., 2001]. Tato pozorování vedou k hypotéze, že změny v aktivitě obou typů 11 β HSD vyvolané účinky prozánětlivých cytokinů (TNF- α , IL-1 β) působí jako zpětná vazba v regulaci zánětu [Escher a kol., 1997; Thieringer a kol., 2001; Rae a kol., 2004]. Gastrointestinální systém, obzvláště pak tlusté a tenké střevo a tračník, je neustále vystaven styku s bakteriemi a mikroorganismy (symbiotickými či s patogenním nebo potenciálně patogenním účinkem). Často zde tedy dochází k výskytu zánětů. Pojem „nespecifické záněty střeva“ zahrnuje různá zánětlivá onemocnění s překrývajícími se klinickými, patologickoanatomickými a epidemiologickými nálezy, ale bez definitivně vyřešené etiologie [Merckův manuál, české vydání, 1996, str. 733]. V angličtině se pro tento jev používá termín inflammatory bowel disease (IBD). Tyto záněty jsou v populaci poměrně časté a mezi nejobvyklejší a zdravotnický nejvýznamnější patří Crohnova choroba (CD) a ulcerózní kolitida (UC). K léčbě těchto nemocí se již od 50. let využívají glukokortikoidy. Hlavním účinkem glukokortikoidů je snižování množství prozánětlivých cytokinů. Prozánětlivé cytokiny, jako jsou TNF- α a IL-1 β , stimulují HPA osu, čímž způsobí zvýšení plasmatické hladiny glukokortikoidů [Besedovsky a del Rey, 1996]. Biologická aktivita glukokortikoidů v cílových tkáních nezávisí pouze na plasmatické koncentraci, množství glukokortikoidních receptorů nebo schopnosti cílové buňky reagovat na dané podněty, ale také na jejich lokálním metabolismu, který je katalysován 11 β -hydroxysteroiddehydrogenasami [Draper a Stewart, 2005].

3 CÍLE PRÁCE

Po vystavení zánětlivému stimulu dojde v různých typech buněk, jako jsou osteoblasty [Cooper a kol., 2001], buňky hladké svaloviny [Cai a kol., 2001], adipocyty [Tomlinson a kol., 2001] a makrofágy [Thieringer a kol., 2001], ke zvýšení exprese a enzymatické aktivity 11 β HSD1 a na druhé straně u 11 β HSD2 dojde k jejich snížení. Na základě těchto studií vznikla hypotéza, že zvýšení množství prozánětlivých cytokinů má za následek vliv na metabolismus glukokortikoidů, čímž způsobí změny v jejich synthese a koncentraci. Tato domněnka byla podpořena výzkumy jak na zvířecích modelech *in vivo*, tak u pacientů s kolitidou. U krys dochází během střevního zánětu indukovaného kyselinou 2,4,6-trinitrobenzensulfonovou (2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid, TNBS) nebo dextran síranem sodným (dextran sulfate sodium, DSS) ke zvýšení exprese střevní 11 β HSD1 [Bryndová a kol., 2004; Vágnerová a kol., 2006; Ergang a kol., 2008]. U pacientů s ulcerózní kolitidou rovněž dochází k lokální aktivaci glukokortikoidů pomocí zvýšení exprese 11 β HSD1 [Žbáňková a kol., 2007]. Cílem mé práce bylo prokázat, zda tyto změny v lokálním metabolismu glukokortikoidů jsou způsobeny účinkem prozánětlivých cytokinů TNF- α a IL-1 β , jejichž exprese je v zánětlivých tkáních prokazatelně zvýšena, jak bylo popsáno výše. Další otázkou bylo, zda zvýšení koncentrace 11 β HSD1 není způsobeno vcestováním buněk imunitního systému do oblasti zánětu přímo z krve a naopak zda snížení exprese 11 β HSD2 není následkem poškození epitheliálních buněk během zánětu. Pro eliminaci této domněnky byl zvolen *in vitro* experiment s orgánovými kulturami, ke kterým byly poté přidány cytokiny TNF- α a IL-1 β , čímž se simulovalo zánětlivé prostředí. Mým úkolem rovněž bylo optimalizovat podmínky pro udržení střevní primokultury po dobu 3 dní a volba vhodného normalizačního faktoru pro navržené experimenty. Po ověření výše uvedených otázek bylo mým úkolem lokalizovat část tračníku, kde k těmto změnám v metabolismu glukokortikoidů dochází. Byl proto proveden experiment s tkáňovou kulturou lidské epitheliální buněčné linie HT-29.

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 EXPERIMENTÁLNÍ MODEL

Na pokusy byla použita mláďata (samci, stáří 7 dní) potkanů Wistar z konvenčního chovu. Potkani (rodiče) byli chováni ve standardním chovném cyklu 12/12 hodin den/noc a měli volný přístup k potravě a vodě. Mláďata byla odebrána matce a usmrcena dekapitací s následnou aseptickou izolací distálního tračníku v laminárním boxu.

4.2 PŘÍPRAVA TKÁŇOVÉ KULTURY

Pro experimenty byla použita stabilizovaná lidská epitheliální buněčná linie HT-29³. Buněčná linie byla získána v zmraženém stavu z ATCC (American Type Culture Collection). Po rozmražení byla oživena standardním způsobem podle předpisu výrobce. Buňky byly rozmrazeny v lázni při 37 °C co nejrychleji. Buněčná suspenze byla centrifugována při 700 x g po dobu 3 minut. Bylo odstraněno mrazicí medium a buňky byly 3x promyty DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium nebo Dulbecco/Vogt modified Eagle's minimal essential medium, Biochrom) s 10% FBS (fetal bovine serum, Biochrom) s přidavkem 0,1 mM penicilinu (Baria), 0,1 mM streptomycinu (Baria)

³ HT-29 (American Type Cell Culture, ATCC, number: HTB-38) je kontinuální lidská epitheliální buněčná linie odvozená z kolorektálního adenokarcinomu tračníku izolovaného z nádoru ženy bílé pleti v roce 1964 v Sloan-Kettering Cancer Center. Buňky si v této dlouhodobé kultuře podržely schopnost syntetizovat hlavní antigeny nádorů tračníku a dosud vykazují příslušnost k původní krevní skupině „dárkyně“ nádoru. Je to adherentní tumorigenní linie s aktivovanými onkogeny: myc+; ras+; myb+; fos+; sis+; p53+; abl-; ros-; src-.

Udávané ultrastrukturní vlastnosti buněk HT-29 zahrnují mikrovilli, mikrofilamenty, mitochondrie obsahující vzduchové dutinky, hladké a drsné endoplasmatické retikulum s volnými ribosomy, tukové kapky, několik primárních a mnoho sekundárních lysosomů. Buňky produkují urokinázové receptory, ale nemají měřitelnou aktivitu aktivátoru plazminogenu (Reiter a kol., 1993). Buňky HT-29 jsou negativní na CD4, ale vykazují povrchovou expresi ceramidu galaktosy (možného alternativního receptoru pro HIV). Vyskytuje se zde G→A mutace v kodonu 273 genu p53 vedoucí k Arg→His substituci.

a 50 μ M gentamycinu (Biochrom). Pokud by došlo k poškození buněk a vytvoření „shluků“, je doporučeno použít na rozvolnění 0,1% roztok dispasy (Sigma). Výsev buněk byl 10^6 buněk /30 cm² plochy lahve v 10 ml DMEM s 10% FBS a suplementací podle výrobce.

Buňky byly pasážovány podle protokolu:

- 1) z kultivační láhve na kultury podle Rouxe bylo odstraněno staré médium
- 2) buňky byly krátce opláchnuty roztokem 0,25% trypsinu (w/v) a 0,53 mM EDTA (kyselina ethylendiamintetraoctová, Biochrom), aby se odstranily zbytky FBS
- 3) do kultivační láhve přidáno 2 -3 ml trypsin/EDTA roztoku tak, aby buňky pokrývala tenká souvislá vrstva
- 4) po 5 až 15 minutách (průběh trypsinizace byl kontrolován pod mikroskopem v 5-ti minutových intervalech) byla trypsinizace zastavena přidáním ekvivalentního objemu DMEM s 10% FBS
- 5) buňky byly opatrně aspirovány pipetou do centrifugační kyvety typu Falcon (50 ml) a centrifugovány při 700 x g a 4 °C po dobu 5 minut ve výkyvném rotoru
- 6) supernatant byl odstraněn odsátím (lze jej též slít inverzí)
- 7) buňky byly resuspendovány v novém médiu DMEM s 10% FBS a vysety v poměru 1:8 až 1:9
- 8) kultivace probíhala při 37 °C a v atmosféře: vzduch 95 %, CO₂ 5 % a 100% vodní aktivita
- 9) médium bylo vyměňováno 2-3 krát do týdne nebo podle potřeby

4.3 PŘÍPRAVA ORGÁNOVÉ KULTURY

Izolovaný tračník byl podélně rozříznut a pečlivě vyčištěn vícenásobným proplachováním v DMEMu. Příčným nařezáním vznikly tkáňové explantáty o rozměrech 1x2 mm, které byly kultivovány v DMEMu s přídavkem nebo bez přídavku 10% FBS, 4,2 g/l glukosy a 2,2 g/l NaHCO₃ po dobu 24 nebo 48 hodin. Petriho misky se vzorky byly uloženy v eksikátoru v atmosféře 5% CO₂ a 95% O₂. Následně byly tkáňové řezy vyjmuty, osušeny od přebytečného média a okamžitě homogenizovány sonikací

v 1 ml RNA Blue (reagens modifikované metody izolace RNA podle Chomczynského). Homogenizovaná tkáň byla uchovávána v mrazící jednotce při teplotě -80 °C.

4.4 IZOLACE TOTÁLNÍ RNA

Po rozmrazení byly vzorky 5 minut inkubovány při laboratorní teplotě, poté bylo přidáno 200 μ l chloroformu (p.a., Serva) s následným protřepáním (15 vteřin). Následně byl vzorek centrifugován 10 minut při 4 °C a 12000 x g. Kapalina vzorku se rozdělila na tři fáze: horní bezbarvou obsahující rozpuštěnou RNA, bílou interfázi (proteiny) a spodní fázi s DNA. Horní fáze byla opatrně odebrána (pouze maximální bezpečný objem) automatickou pipetou a přemístěna do čisté mikrozkuhavky typu Eppendorf. Vzorek byl částečně očištěn od DNA přidavkem 1/10 objemu isopropanolu. Poté byl vzorek centrifugován při 4 °C a 12000 x g po dobu 5 minut. Supernatant byl opět přemístěn do čisté mikrozkuhavky typu Eppendorf. Přidavkem isopropanolu (0,5 ml na 1 ml RNA blue) se RNA precipituje 20 minut při -20 °C. Centrifugací pak byla získána peleta RNA na dně mikrozkuhavky. Isopropanol se opatrně odsál automatickou pipetou, peleta se ve zkuhavce promyla 1 ml 75% etanolu, zkuhavka byla důkladně protřepána a opět centrifugována 10 minut při 4 °C a 12000 x g. Po odstranění supernatantu byla peleta vysušena při 50 °C co možná nejkratší dobu (5 minut). Vzorek při sušení změnil barvu z bílé na průhlednou. Peleta byla rozpuštěna v PCR vodě 30 μ l (filtrovaná a autoklávovaná voda beze stop DNA-as a RNA-as) a zmrazena při -80 °C.

4.5 REVERZNÍ TRANSKRIPCE

Množství RNA bylo kvantifikováno spektrofotometricky při 260 nm na přístroji Nanodrop. Všechny vzorky, které byly použity pro reverzní transkripci, měly poměr A260/A280 větší než 1,85. Pro reverzní transkripci (20 μ l) byla použita souprava chemikálií M-MLV (cat.no.: 28025-013, Invitrogen) přesně podle předpisu výrobce. Do 200 μ l sterilní PCR zkuhavky byl napipetován 1 μ l Random primeru (Invitrogen, 3 μ g/ μ l) a přidáno 10 μ l roztoku RNA s koncentrací 1 μ g/10 μ l. Zkuhavky byly umístěny do přístroje pro PCR cyklicky měnícím teplotu v předem naprogramovaných krocích

(thermocycler, Eppendorf) a byl spuštěn program RT1 (70 °C na 5 minut a víko přístroje 80 °C, pak prudce zchladit na 4 °C). V následném kroku bylo ke vzorku přidáno 9 µl Master mixu a pipetou zamícháno a na 5 vteřin zcentrifugováno na stolní centrifuze při nízkých otáčkách.

Master mix/1vzorek: 5x First strand buffer 4 µl, DTT 2 µl, dNTP mix (obsahujícího 10 mM dATP, 10 mM dCTP, 10 mM dGTP a 10 mM dTTP) 1 µl, M-MLV 1 µl, RNase OUT (Recombinant Ribonuclease Inhibitor, rekombinantní ribonukleázový inhibitor; Invitrogen) 1 µl.

Byla provedena reverzní transkripce při 37 °C po dobu 1 hodiny, pak následovala denaturace zbylé RNA při 95 °C 5 minut. Získaná cDNA byla 5x naředěna PCR vodou.

4.6 Q-PCR (SYBR GREEN)

Získaná cDNA z předchozího kroku byla použita pro relativní kvantifikaci mRNA jednotlivých genů metodou SYBR Green na přístroji Lightcycler 1.0 (Roche). PCR reakce probíhala v skleněných kapilárách (LightCycler Capillaries cat.no: 04929292001) v objemu 20 µl v hot start Master mixu o složení DNA Master Sybr Green I mix, primery 0,5 µM a MgCl₂ 4 mM. Čistota PCR produktu byla ověřena rozpouštěcí analýzou (melting analysis). Primery byly navrženy v programu DNA STAR a vyrobeny na objednávku u firmy VBC-Genomics Bioscience Research, Vídeň, Rakousko. Příklady standardní amplifikační křivky pro 18SRNA a rozpouštěcí analýsy produktu pro 18SRNA jsou uvedeny na obrázcích 4.6.1 a 4.6.2 (str. 43 a 44).

Sekvence primerů a programy:

18SRNA: (5'-3')

sense GTA ACC CGT TGA ACC CCA TT

antisense CCA TCC AAT CGG TAG TAG CG

Program 18SRNA:

preinkubace 95 °C 600 vteřin

denaturace DNA 95 °C 10 vteřin

nasedání primerů 58 °C 10 vteřin

akvizice 72 °C 19 vteřin a 40 cyklů

rozpuštěcí analýza 72 °C 10 vteřin, 97 °C 10 vteřin krok 0,1 °C /vteřina

β -aktin: (5'-3')

sense GGA TCT TCA TGA GGT AGT CTG TC

antisense CCT CGC CTT TGC CGA TCC

Program β -aktin:

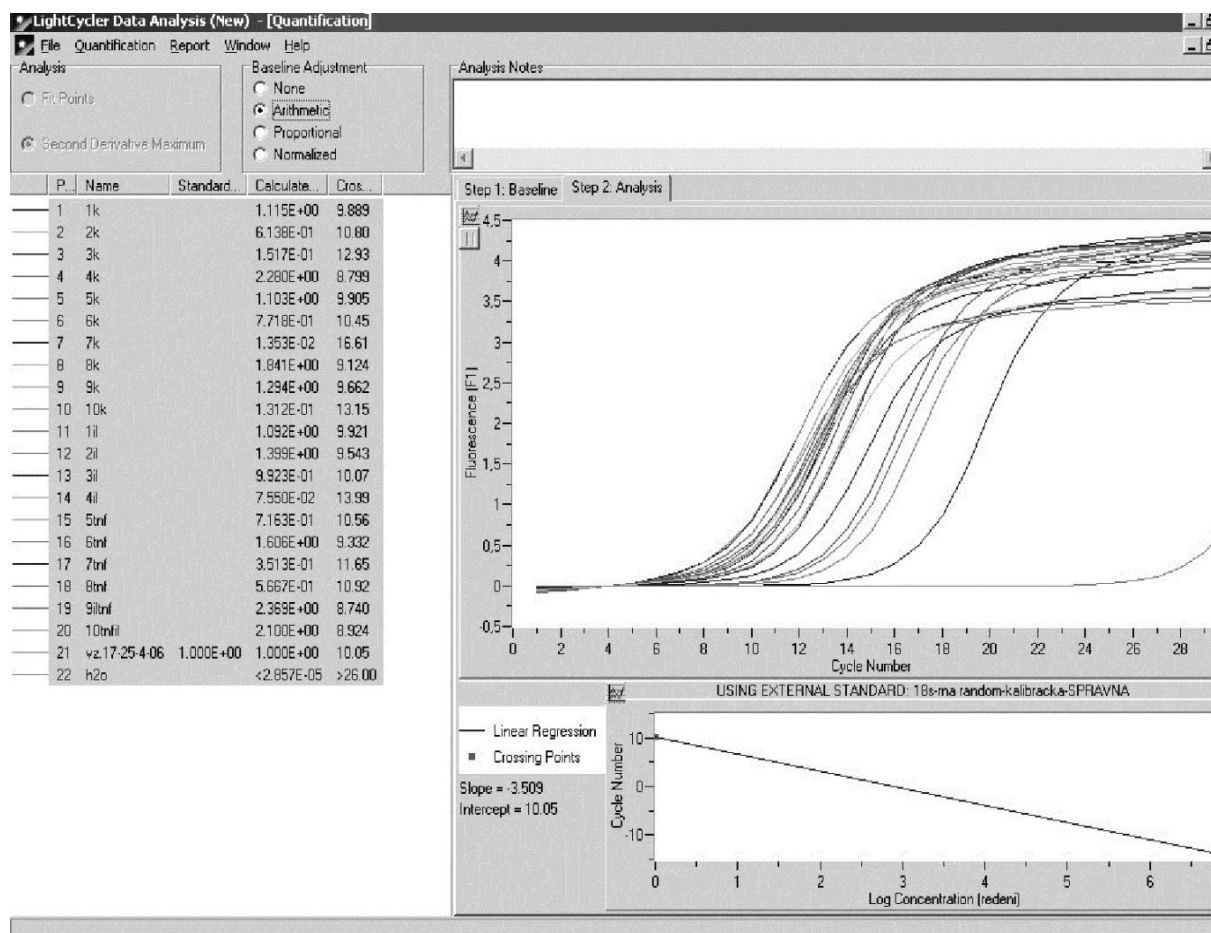
preinkubace 95 °C 600 vteřin

denaturace 95 °C 15 vteřin

nasedání primerů 54 °C 10 vteřin

akvizice 72 °C 7 vteřin a 40 cyklů

rozpuštěcí analýza 72 °C 10 vteřin, 97 °C 10 vteřin krok 0,1 °C /vteřina



Obr. 4.6.1 Standardní amplifikační křivka pro 18SRNA

11 β HSD1: (5'-3')

sense CCC TGT CGG ATG GCT TTT

antisense ATG, ACT TGC TTG CAG AAT AGG

Program 11 β HSD1:

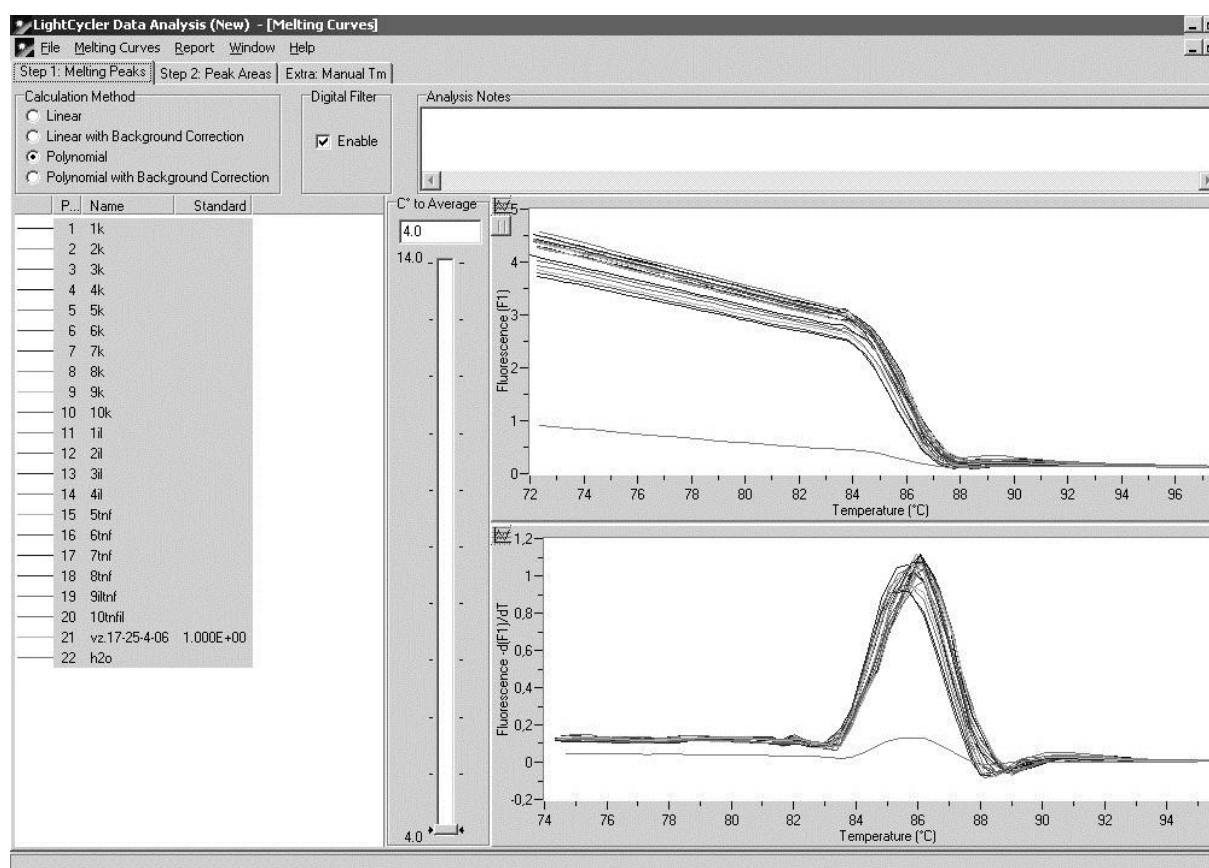
preinkubace 95 °C 600 vteřin

denaturace 95 °C 10 vteřin

nasedání primerů 56 °C 10 vteřin

akvizice 72 °C 12 vteřin a 40 cyklů

rozpuštěcí analýza 72 °C 10 vteřin, 97 °C 10 vteřin krok 0,1 °C /vteřina



Obr. 4.6.2 Rozpuštěcí analýza produktu pro 18SRNA

11 β HSD2: (5'-3')

sense ACC GTA TTG GAG TTG AAC AGC

antisense TCA CTG ACT CTG TCT TGA AGC

Program 11 β HSD2:

preinkubace 95 °C 600 vteřin

denaturace 95 °C 10 vteřin

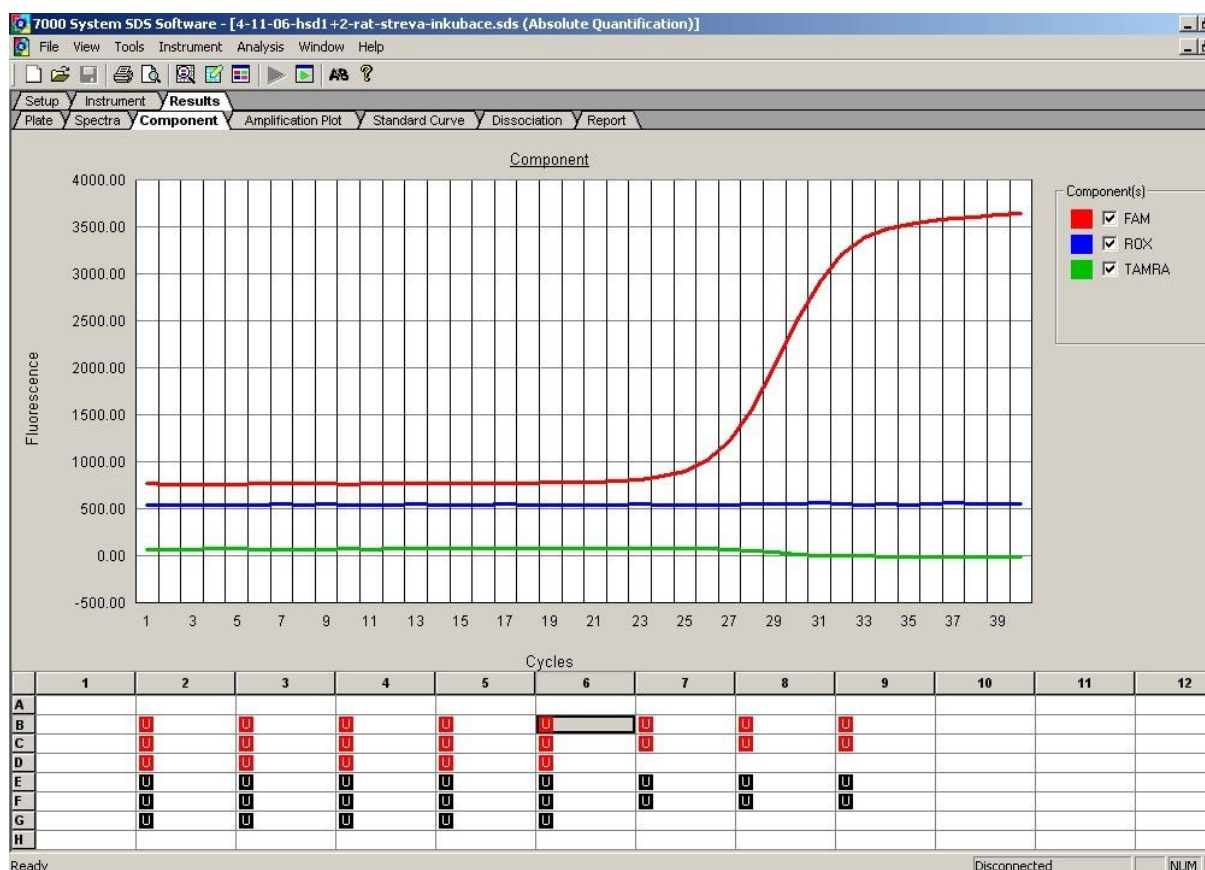
nasedání primerů 60 °C 20 vteřin

akvizice 72 °C 20 vteřin a 40 cyklů

rozpuštěcí analýza 72 °C 10 vteřin, 97 °C 10 vteřin krok 0,1 °C /vteřina

4.7 Q-PCR (TAQMAN)

Pro kvantifikaci mRNA pro 11 β HSD1, 11 β HSD2 a GAPDH byly použity komerčně dostupné Taqman fluorescenčně značené hydrolysuující proby od Applied Biosystems podle návodu. Master mix pro jeden vzorek byl připraven smícháním 15 μ l 2x TaqMan Gene Expression Master Mix (cat.no: 4369016, Applied biosystems), 1 μ l FAM/TAMRA proby pro gen: (11 β HSD1 Rn00567167_m1, 11 β HSD2 Rn00492539_m1), 1 μ l VIC/MGB referenčního genu (housekeeping) Rat GAPDH (cat.no: 4352338E, Applied Biosystems) a 12 μ l PCR vody. Master mix byl rozdělen pomocí pipety do mikrotitrační 96-ti jamkové PCR destičky (MicroAmp Optical 96-well reaction plate; cat.no.:4306737), poté se do každé mikrozkušavky v destičce přidal 1 μ l 5x ředěné cDNA z různých vzorků a destička se přikryla opticky propustným víčkem (Optical cap; cat.no: 4323032). Real-time RT-PCR se prováděla v přístroji Abi prism 7000 podle programu, kde první krok je 50 °C 2 minuty, dále „hot start“ 95 °C 10 minut, poté 50 cyklů 95 °C po patnácti vteřinách a následně 1 minuta akvizice při 60 °C. Zkoumané geny a referenční geny (housekeeping) byly měřeny v duplexní reakci. Kalibrační křivky pro jednotlivé geny byly zkonstruovány ze standardní cDNA desítkovou ředící řadou. Příklad amplifikační křivky pro 11 β HSD1 je vyobrazen na obrázku 4.7.1 (str. 46).



Obr. 4.7.1 Amplifikační křivka pro 11βHSD1

4.8 VYHODNOCENÍ

Expres genů byly přepočítány pomocí kalibrační křivky pro jednotlivé geny. Výsledné relativní exprese byly vyjádřeny jako poměr relativních koncentrací genu a koncentrace normalizačního faktoru (housekeeping genu).

4.9 STATISTICKÉ METODY

Všechna data byla vyjádřena jako aritmetické průměry \pm SEM (standard error of mean) nebo mediány s hodnotami percentil 10 % - 90 %. U všech výsledků byla otestována normalita. U výsledků z pokusů s orgánovými kulturami byl proveden dvouvýběrový F-test pro rozptyl a dvouvýběrový Studentův t-test s nerovností rozptylů.

Hladina významnosti byla zvolena jako $P < 0,01$. Výsledky pokusů s buněčnými liniemi byly podrobeny analýze rozptylu ANOVA (analysis of variance).

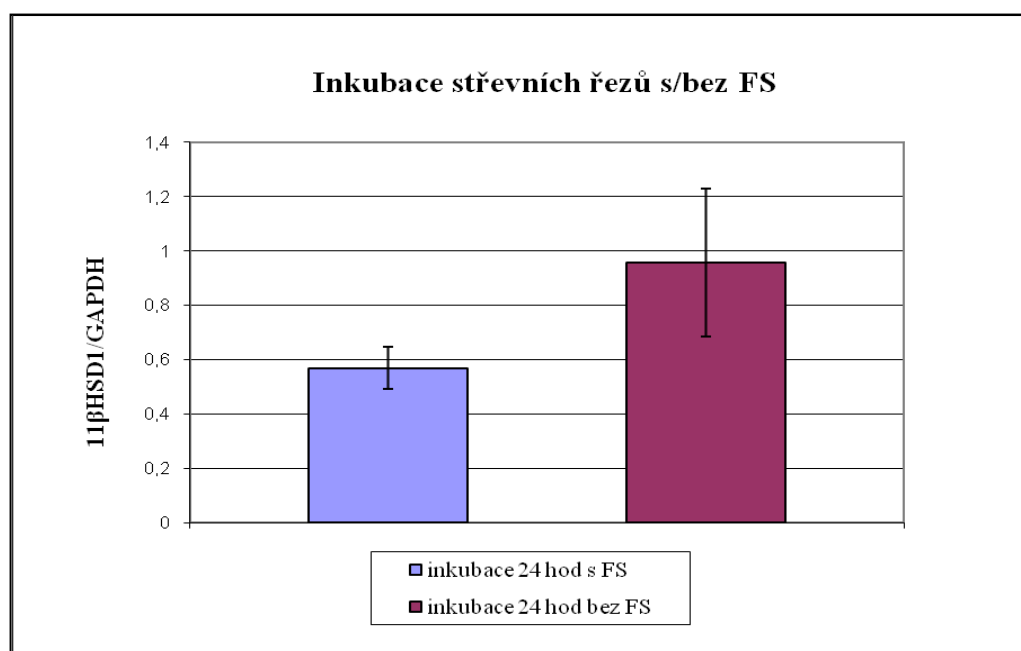
5 VÝSLEDKY

5.1 OPTIMALIZACE EXPERIMENTÁLNÍCH PODMÍNEK

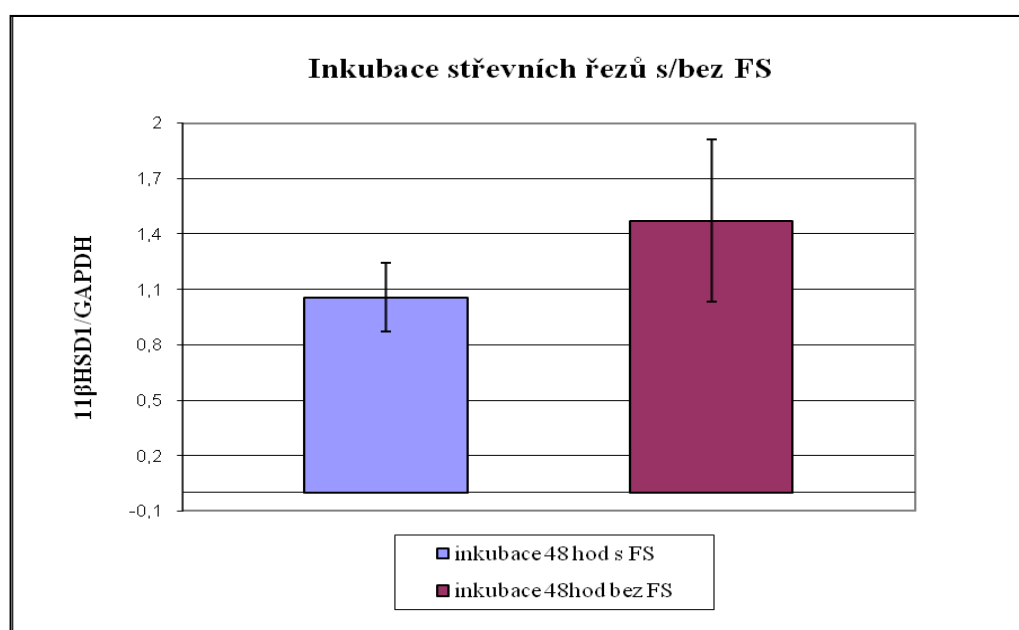
Nejprve bylo mým úkolem stanovit vhodné experimentální podmínky pro udržení orgánových kultur vzorků 1x2 mm vytvořených z asepticky odebraného distálního tračníku 7denních potkaních samců. Dalším zadáním byla volba vhodného normalizačního faktoru pro experimenty s orgánovými kulturami i s buněčnou linií HT-29.

5.1.1 OPTIMALIZACE PODMÍNEK PRO UDRŽENÍ STŘEVNÍ PRIMOKULTURY PO DOBU 3 DNÍ

Byly provedeny dva experimenty, během kterých byly střevní explantáty v Petriho miskách v DMEMu v atmosféře 5% CO₂ a 95% O₂. V prvním experimentu bylo do inkubačního média přidáno 10% fetálního séra a v experimentu druhém byl jeho přídatek vynechán. V obou případech byly vzorky uchovávány po dobu 24, 48 a 72 hodin. Vzorky byly následně zpracovány do formy RNA, cDNA a poté byla provedena Q-PCR. V jednotlivých vzorcích byla měřena exprese mRNA 11βHSD1 a normalizačního (housekeeping) genu GAPDH. Výsledky ukázaly, že přítomnost fetálního séra signifikantně nezvyšuje expresi mRNA 11βHSD1 po 24 hodinách (obrázek 5.1; str. 49) a ani po 48 hodinách (obrázek 5.2; str. 49). Při udržování primokultur po dobu 72 hodin došlo u vzorků bez přídavku fetálního séra k poškození tkáně, a tím k jejich znehodnocení. Z toho důvodu byla tato doba pro další pokusy vyloučena jako nevhodná.



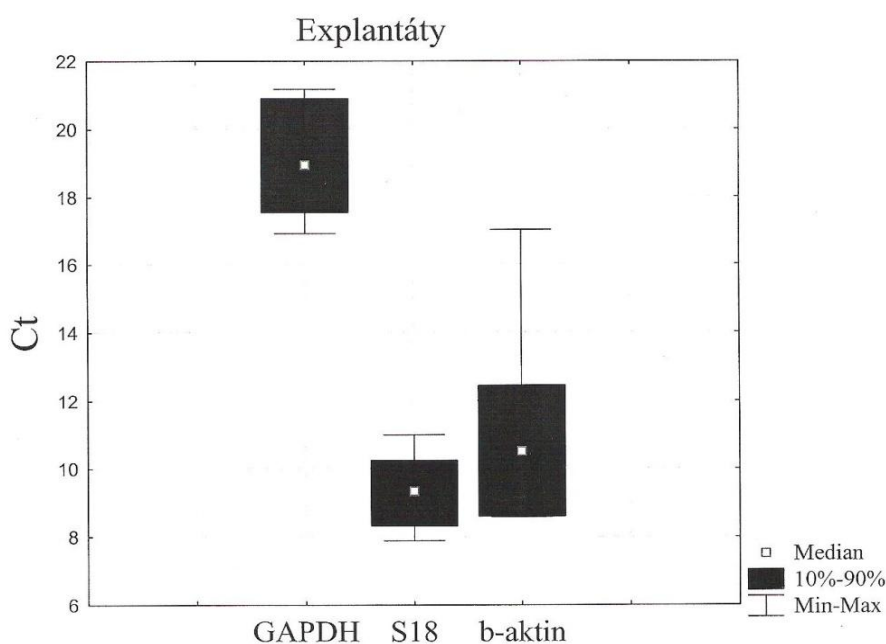
Obr. 5.1 Inkubace střevních řezů v přítomnosti a bez přítomnosti fetálního séra po dobu 24 hodin. Hodnoty relativní exprese mRNA 11βHSD1 byly normalizovány pomocí exprese mRNA normalizačního faktoru GAPDH. Data jsou uvedena jako aritmetický průměr ± SEM (inkubace s fetálním sérem (s FS), n=4; inkubace bez fetálního séra (bez FS), n=4).



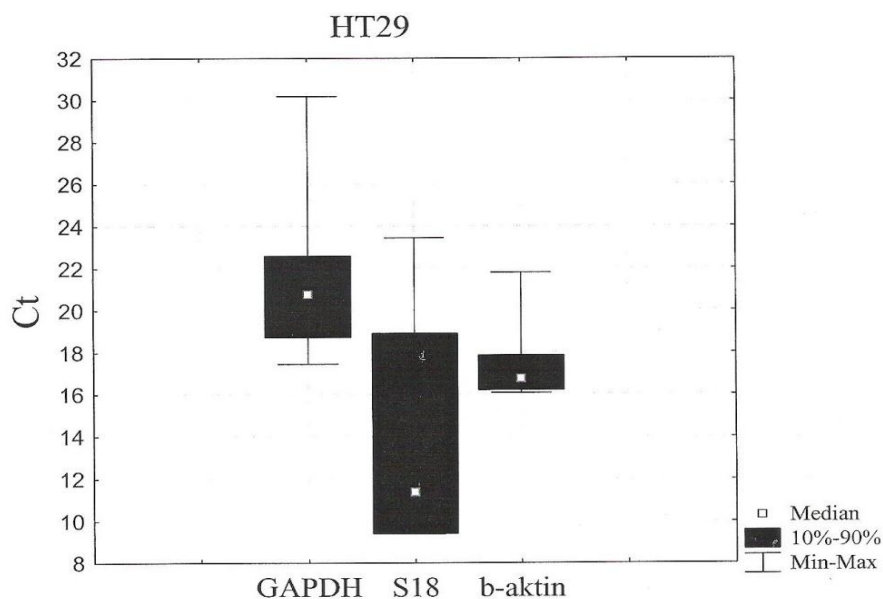
Obr. 5.2 Inkubace střevních řezů v přítomnosti a bez přítomnosti fetálního séra po dobu 48 hodin. Hodnoty relativní exprese mRNA 11βHSD1 byly normalizovány pomocí exprese mRNA normalizačního faktoru GAPDH. Data jsou uvedena jako aritmetický průměr ± SEM (inkubace s fetálním sérem (s FS), n=4; inkubace bez fetálního séra (bez FS), n=4).

5.1.2 OPTIMALIZACE NORMALIZAČNÍHO FAKTORU (HOUSEKEEPING GENU)

Pro výše uvedený experiment byl jako normalizační faktor zvolen nejčastěji používaný normalizační gen GAPDH. Po jeho použití jako normalizačního faktoru při experimentech se studovanými prozánětlivými cytokiny vyšlo najevo, že je jeho exprese zřejmě těmito cytokiny ovlivňována. Proto byly studiem literatury navrženy dva jiné normalizační faktory (18SRNA a β -aktin). Při měření vzorků střevních řezů pomocí Q-PCR dochází k nejmenšímu rozptylu hodnot Ct (threshold cycle), a tím pádem i hodnot exprese mRNA u genu 18SRNA (obrázek 5.3). 18SRNA byl tedy zvolen jako normalizační faktor pro experimenty se střevními explantáty. Analýza výsledků Q-PCR vzorků buněčné linie HT-29 ukázala, že pro tento typ experimentů bude vhodnějším kandidátem β -aktin, protože rozptyl hodnot Ct je v tomto případě oproti 18SRNA minimální (obrázek 5.4; str. 51).



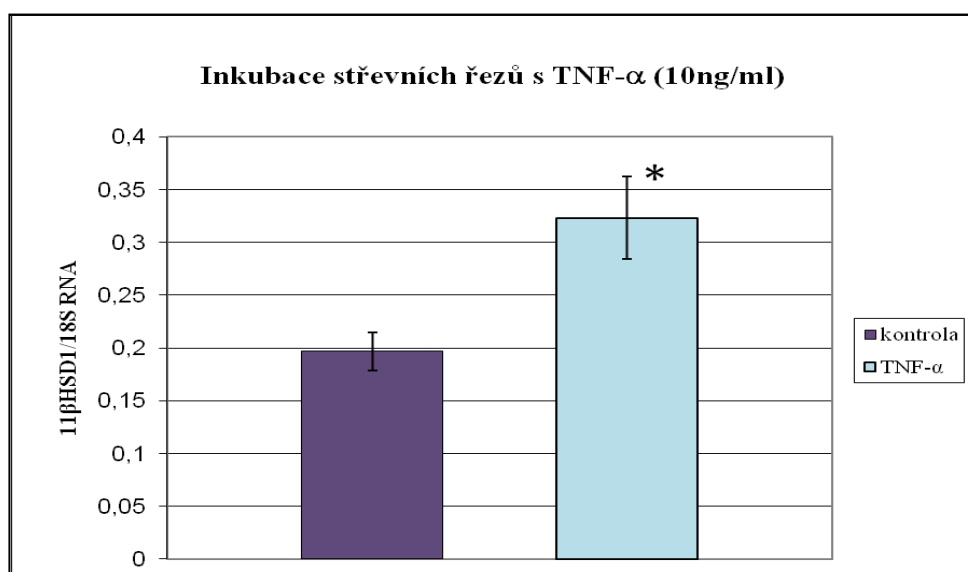
Obr. 5.3 Hodnoty exprese zvolených normalizačních faktorů GAPDH, 18SRNA a β -aktinu ve střevních explantátech. Data jsou uvedena jako mediány (bílé body), percentily 10 % - 90 % (černé obdélníky) a rozsahy minimálních až maximálních hodnot (úsečky), Ct - threshold cycle.



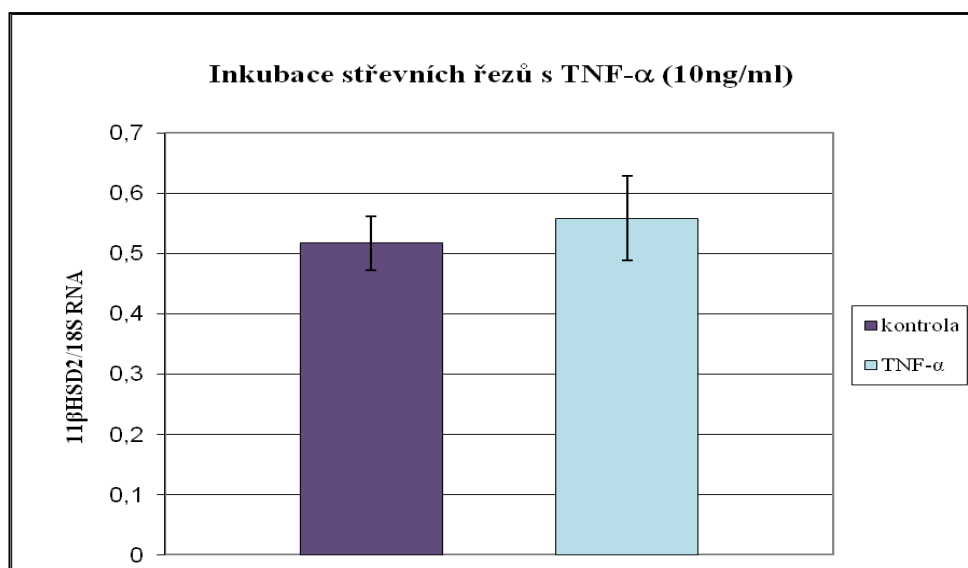
Obr. 5.4 Hodnoty exprese zvolených normalizačních faktorů GAPDH, 18SRNA a β -aktinu v buněčné linii HT-29. Data jsou uvedena jako mediány (bílé body), percentily 10 % - 90 % (černé obdélníky) a rozsahy minimálních až maximálních hodnot (úsečky), Ct - threshold cycle.

5.2 OVLIVNĚNÍ STŘEVNÍ PRIMOKULTURY A BUNĚČNÉ LINIE HT-29 PŘÍDAVKEM IL-1 β A TNF- α

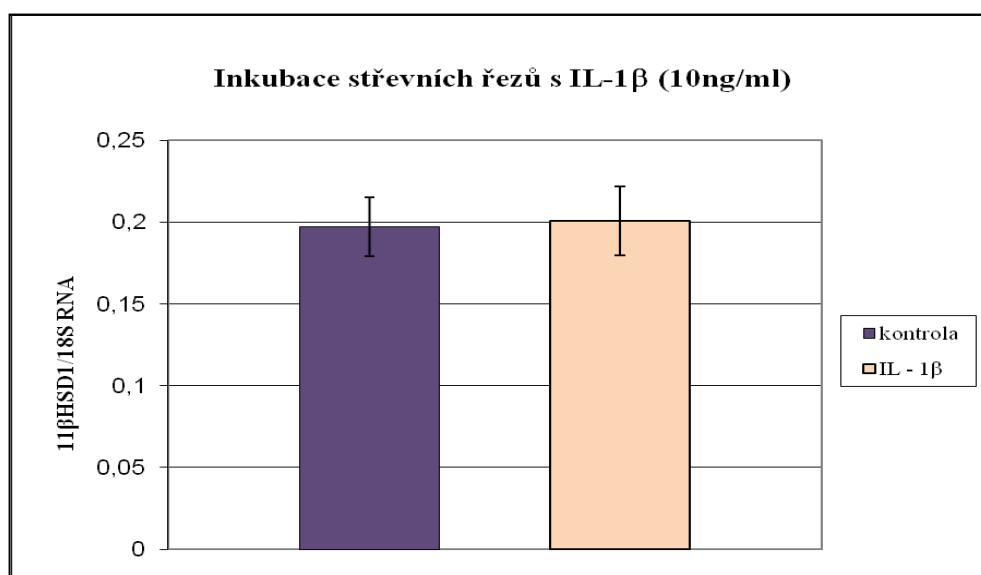
Pro zjištění, zda prozánětlivé cytokiny IL-1 β a TNF- α zvyšují expresi mRNA 11 β HSD1 a naopak snižují expresi 11 β HSD2 jako je tomu u pacientů s kolitidou [Žbáňková a kol., 2007; Ergang a kol., 2008] také *in vitro*, byly střevní explantáty inkubovány za přítomnosti IL-1 β (10 ng/ml) a TNF- α (10 ng/ml) po dobu 24 a 48 hodin. Inkubované vzorky ovlivněné cytokiny a kontrolní vzorky bez přídatku cytokinů byly zpracovány do formy RNA, cDNA a poté byla provedena Q-PCR. Bylo zjištěno, že exprese mRNA 11 β HSD1 ani 11 β HSD2 není délkou působení daných cytokinů na střevní explantáty ovlivněna, proto jsou uvedená data pouze z měření provedených po 48 hodinách. Účinkem TNF- α (10 ng/ml) na střevní explantáty po dobu 48 hodin se



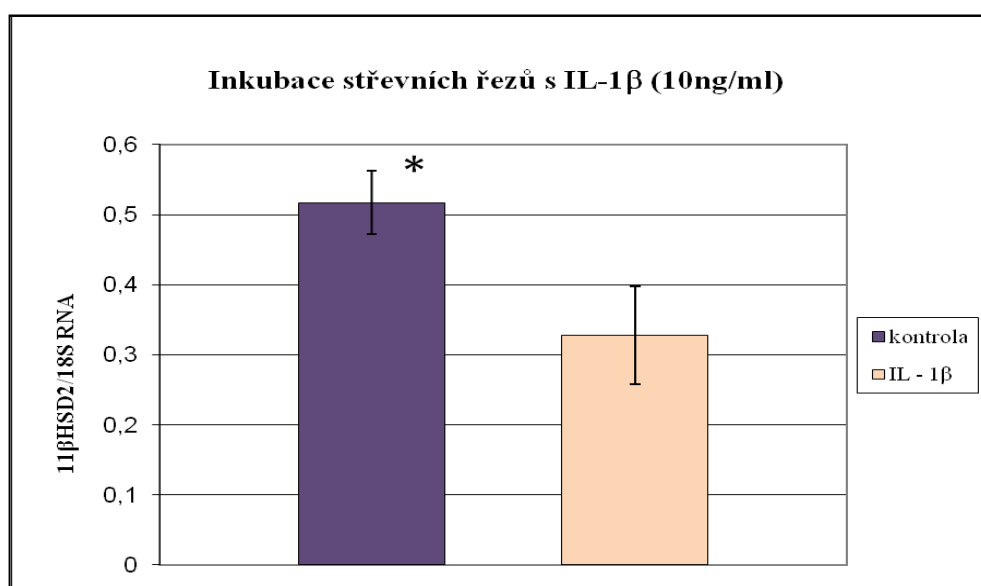
Obr. 5.5 Expres mRNA 11 β HSD1 ve střevních řezích stimulovaných TNF- α o koncentraci 10 ng/ml a v kontrolních střevních řezích. Hodnoty relativní exprese mRNA 11 β HSD1 byly normalizovány pomocí exprese mRNA normalizačního faktoru 18SRNA zvoleného na základě vyhodnocení grafu z kapitoly 5.1.2 (viz obrázek 5.3; str. 50). Data jsou uvedena jako aritmetický průměr \pm SEM (kontrola, n=64; stimulace střevních řezů TNF- α (TNF- α), n=46). Hladina významnosti *P< 0,01 ve srovnání s kontrolami.



Obr. 5.6 Expres mRNA 11 β HSD2 ve střevních řezích stimulovaných TNF- α o koncentraci 10 ng/ml a v kontrolních střevních řezích. Hodnoty relativní exprese mRNA 11 β HSD2 byly normalizovány pomocí exprese mRNA normalizačního faktoru 18SRNA zvoleného na základě vyhodnocení grafu z kapitoly 5.1.2 (viz obrázek 5.3; str. 50). Data jsou uvedena jako aritmetický průměr \pm SEM (kontrola, n=76; stimulace střevních řezů TNF- α (TNF- α), n=40).



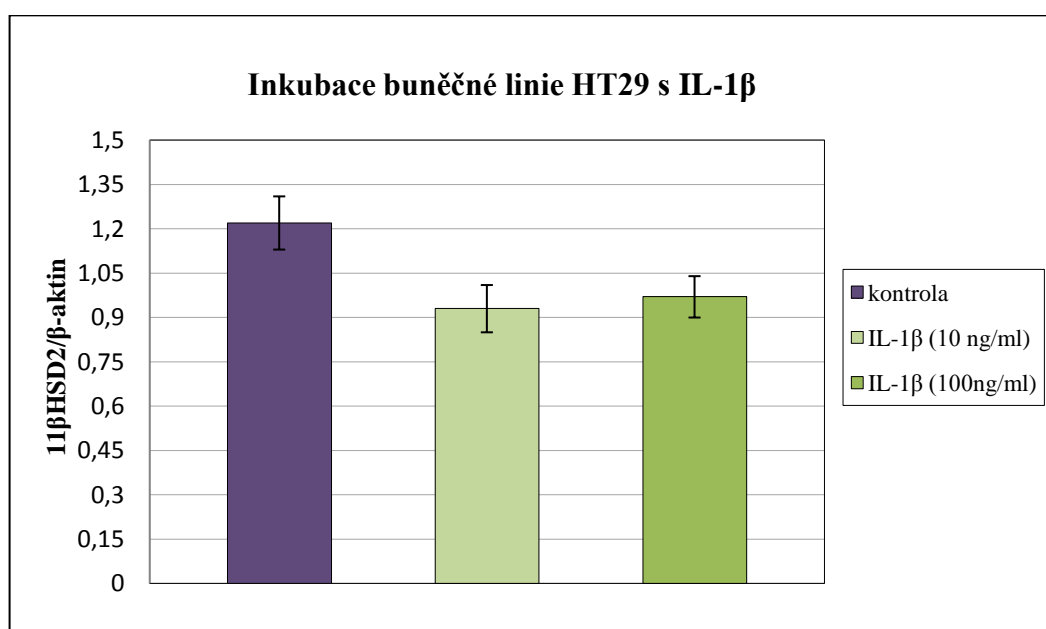
Obr. 5.7 Expres mRNA 11βHSD1 ve střevních řezech stimulovaných IL-1β o koncentraci 10 ng/ml a v kontrolních střevních řezech. Hodnoty relativní exprese mRNA 11βHSD1 byly normalizovány pomocí exprese mRNA normalizačního faktoru 18SRNA zvoleného na základě vyhodnocení grafu z kapitoly 5.1.2 (viz obrázek 5.3; str. 50). Data jsou uvedena jako aritmetický průměr ± SEM (kontrola, n=64; stimulace střevních řezů IL-1β (IL-1β), n=25).



Obr. 5.8 Expres mRNA 11βHSD2 ve střevních řezech stimulovaných IL-1β o koncentraci 10 ng/ml a v kontrolních střevních řezech. Hodnoty relativní exprese mRNA 11βHSD2 byly normalizovány pomocí exprese mRNA normalizačního faktoru 18SRNA zvoleného na základě vyhodnocení grafu z kapitoly 5.1.2 (viz obrázek 5.3; str. 50). Data jsou uvedena jako aritmetický průměr ± SEM (kontrola, n=76; stimulace střevních řezů IL-1β (IL-1β), n=32). Hladina významnosti *P< 0,01 ve srovnání s kontrolami.

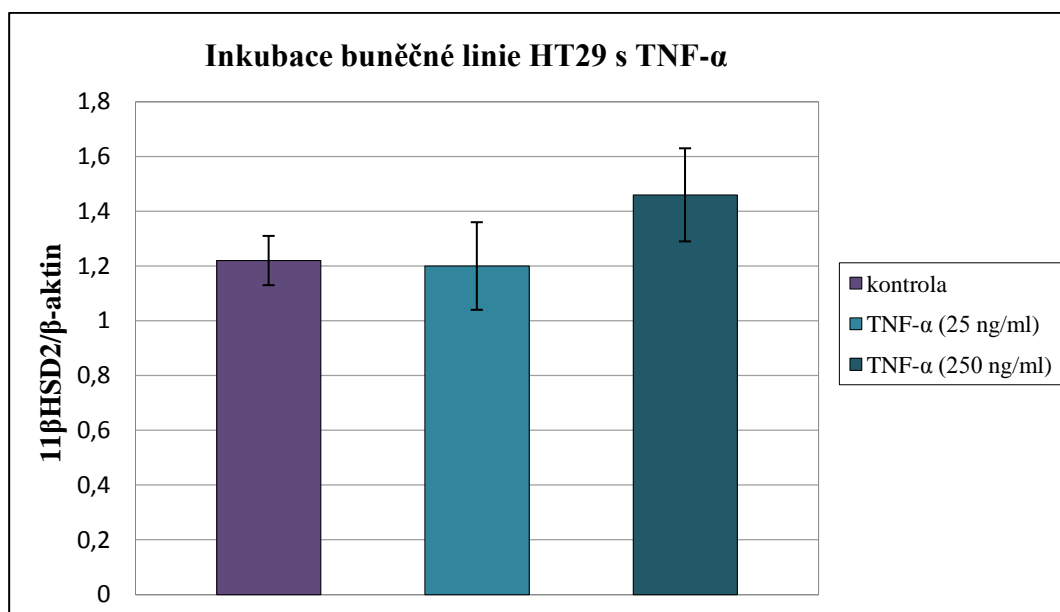
exprese 11 β HSD1 signifikantně zvýšila oproti kontrole (obrázek 5.5; str. 52). Na druhé straně exprese 11 β HSD2 nebyla inkubací s TNF- α (10 ng/ml) ovlivněna (obrázek 5.6; str. 52). Naopak ovlivněním střevních explantátů IL-1 β (10 ng/ml) po dobu 48 hodin došlo k signifikantnímu zvýšení exprese 11 β HSD2 (obrázek 5.8; str. 53), ale exprese 11 β HSD1 (obrázek 5.7; str. 53) ovlivněna nebyla.

Pro zjištění, zda modulace exprese 11 β HSD je způsobena přímým působením prozánětlivých cytokinů TNF- α a IL-1 β na epitheliální buňky střeva byl proveden experiment s kontinuální lidskou epitheliální buněčnou linií odvozenou z kolorektálního adenokarcinomu tračniku HT-29. Tyto buňky byly inkubovány s cytokiny TNF- α o koncentraci 25 ng/ml a 250 ng/ml a s IL-1 β o koncentraci 10 ng/ml a 100 ng/ml.



Obr. 5.9 Expres mRNA 11 β HSD2 v kultuře buněčné linie HT-29 stimulované IL-1 β o koncentraci 10 ng/ml a 100 ng/ml a v kontrolní kultuře HT-29 bez stimulace. Hodnoty relativní exprese mRNA 11 β HSD2 byly normalizovány pomocí exprese mRNA normalizačního faktoru β -aktinu zvoleného na základě vyhodnocení grafu z kapitoly 5.1.2 (viz obrázek 5.4; str. 51). Data jsou uvedena jako aritmetický průměr \pm SEM (kontrola, n=24; stimulace HT-29 IL-1 β 10 ng/ml (IL-1 β (10 ng/ml)), n=11; stimulace HT-29 IL-1 β 100 ng/ml (IL-1 β (100 ng/ml)), n=4).

V jednotlivých pokusech byla měřena pouze exprese 11 β HSD2 vzhledem k tomu, že tento enzym je dominantně exprimován buňkami povrchového epitelu a krypt [Whorwood a kol., 1994]. Experiment ukázal, že vlivem IL-1 β sice došlo k poklesu množství mRNA pro 11 β HSD2 v buněčné linii HT-29 (obrázek 5.9; str. 54), ale ani jeden ze zkoumaných cytokinů neměl na tuto linii signifikantní vliv. Výsledky pokusu inkubace buněčné linie HT-29 s TNF- α zobrazuje obrázek 5.10.



Obr. 5.10 Expres mRNA 11 β HSD2 v kultuře buněčné linie HT-29 stimulované TNF- α o koncentraci 25 ng/ml a 250 ng/ml a v kontrolní kultuře buněčné linie HT-29 bez stimulace. Hodnoty relativní exprese mRNA 11 β HSD2 byly normalizovány pomocí exprese mRNA normalizačního faktoru β -aktinu zvoleného na základě vyhodnocení grafu z kapitoly 5.1.2 (viz obrázek 5.4; str. 51). Data jsou uvedena jako aritmetický průměr \pm SEM (kontrola, n=24; stimulace HT-29 TNF- α o koncentraci 25 ng/ml (TNF- α (25 ng/ml)), n=8; stimulace HT-29 TNF- α o koncentraci 250 ng/ml (TNF- α (250 ng/ml)), n=8).

6 DISKUSE

V předchozích kapitolách bylo popsáno, že 11 β HSD se podílí na prereceptorovém metabolismu glukokortikoidů. Zatímco 11 β HSD1 se *in vivo* účastní přeměny biologicky neaktivních forem glukokortikoidů na formy aktivní, čímž umožňuje navázání na GR, 11 β HSD2 má za úkol jejich opětovnou biologickou inaktivaci. Změny v expresi 11 β HSD jsou *in vivo* spojeny s působením zánětu u lidí i experimentálních zvířat [Žbáňková a kol., 2007; Ergang a kol., 2008; Vágnerová a kol., 2006]. Jedním z mých úkolů bylo zjistit, zda k těmto změnám dochází rovněž v modelu *in vitro* v prostředí simulovaného zánětu vyvolaném působením prozánětlivých cytokinů TNF- α a IL-1 β . Dále pak zjištění, zda ke změnám dochází také v čisté epitheliální buněčné linii HT-29. Dalším zadáním pak bylo stanovení vhodných podmínek pro uchování orgánových kultur a volba vhodných normalizačních faktorů pro jednotlivé navržené experimenty.

6.1 OPTIMALIZACE PODMÍNEK PRO UDRŽENÍ STŘEVNÍ PRIMOKULTURY PO DOBU 3 DNÍ

Při přípravě standardní střevní primokultury se jako přídavek do kultivačního media používá fetální hovězí sérum (FBS) nebo fetální telecí sérum (FCS) v koncentracích 5-20 %. FBS obsahuje růstové faktory (GM-CSF, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor; EGF, epidermal growth factor; G-CSF, granulocyte colony-stimulating factor), steroidní hormony a cytokiny. Tyto látky podporují růst, diferenciaci a proliferaci buněk a umožňují přežívání a udržení buněčné kultury hlavně při vysokých koncentracích FBS. Při sledování vlivu cytokinů na lokální metabolismus glukokortikoidů mohou růstové faktory obsažené v FBS negativně ovlivnit expresi a aktivitu sledovaných genů. FBS rovněž různými způsoby ovlivňuje jednotlivé vrstvy střeva, např. inhibuje syntézu kolagenu ve fibroblastech [Martens a kol., 1992], zvyšuje sekreci mucinu v gobletových buňkách, proliferaci epitheliálních buněk a syntézu DNA a pomáhá udržet architekturu krypt [Usugane a kol., 1982].

Z výsledků uvedených v kapitole 4.1.1 je patrné, že ve střevních tkáňových řezech FBS signifikantně neovlivňuje expresi 11 β HSD1. Z literatury je ale známo, že přídavek

FBS může negativně ovlivnit experimenty se stimulací tkáňových řezů IL-1 β a TNF- α například absorpcí těchto cytokinů na proteiny FBS. Negativním důsledkem nepoužití FBS bylo zkrácení životaschopnosti tkáňových řezů o jeden den oproti předpokladu.

6.2 VÝBĚR NORMALIZAČNÍHO FAKTORU (HOUSEKEEPING GENU)

Výběr vhodného normalizačního faktoru (housekeeping genu) je zcela zásadním kritériem pro porovnání genových expresí mezi jednotlivými vzorky nebo jednotlivými experimenty. Rozdíly v expresi sledovaných genů lze nejlépe rozpoznat porovnáním s expresí mRNA stabilního genu, jehož syntéza je konstitutivní a neovlivněná experimentálním zásahem. Zásadním problémem při navrhování housekeeping genu je fakt, že neexistuje gen, jehož exprese zůstává neměnná v závislosti na věku, pohlaví, typu tkáně, buněčném cyklu a experimentálních podmínkách [Tricarico a kol., 2002].

Studiem literatury byly určeny tři geny (GAPDH, 18SRNA a β -aktin), které mohly být pro navržené experimenty použity jako normalizační geny. Kritériem pro jejich výběr bylo předchozí použití těchto genů jako normalizačních v experimentu s podobnými či stejnými podmínkami, frekvence jejich použití, vysoká exprese a s ní spojená snadná měřitelnost.

Jedním z nejčastěji používaných housekeeping genů je glyceraldehyd-3-fosfátdehydrogenasa (GAPDH). Byly ovšem popsány zásahy, které mohou její expresi ovlivňovat. Například hypoxie zvyšuje expresi GAPDH v kultuře vaskulárních endotheliálních buněk, její expresi lze rovněž zvýšit přidavkem insulinu v nízké koncentraci jako suplementu do kultivačního média kultury adipocytů a v kultuře myších T-lymfocytů je exprese GAPDH zvýšena účinkem IL-2 [Suzuki a kol., 2000]. Proto byl tento normalizační faktor pro experimenty s přidavkem prozánětlivých cytokinů IL-1 β a TNF- α považován za nevhodný.

Druhým pravděpodobně vhodným kandidátem na normalizační gen pro navržený experiment byl gen 18SRNA. Na rozdíl od GAPDH nepředstavuje 18SRNA mRNA, ale rRNA ribosomální podjednotky. Z toho důvodu nemusí vždy 18SRNA odrážet celkovou

synthesu mRNA, jelikož celková změna syntézy mRNA nemusí vždy vyvolat stejnou změnu rRNA nebo nevyvolá změnu žádnou [Suzuki a kol., 2000].

6.3 OVLIVNĚNÍ STŘEVNÍ PRIMOKULTURY A BUNĚČNÉ LINIE HT-29 PŘÍDAVKEM IL-1 β A TNF- α

V mnoha vědeckých studiích již bylo prokázáno, že prozánětlivé cytokiny indukují nebo zvyšují expresi 11 β HSD1 v různých typech tkání. Například buněčná linie MG-63 za normálních okolností neexprimuje mRNA 11 β HSD1 a ani nevykazuje konverzi kortikosteronu na 11-dehydrokortikosteron. Pokud je tato buněčná linie vystavena vlivu cytokinů IL-1 β a TNF- α , exprese mRNA pro 11 β HSD1 je prudce zvýšena a toto zvýšení je zároveň časově a koncentračně závislé. Exprese mRNA pro 11 β HSD2 byla na druhou stranu po přídávku IL-1 β a TNF- α snížena. Stejný efekt měly cytokiny na reduktasovou aktivitu 11 β HSD1 a oxidasovou aktivitu 11 β HSD2. Z ostatních zkoumaných cytokinů mírně zvýšil expresi 11 β HSD1 pouze IL-6, kdežto ostatní zkoumané cytokiny a hormony neměly na produkci mRNA pro 11 β HSD1 žádný vliv. Zdá se, že zvýšení exprese mRNA pro 11 β HSD1 účinkem těchto cytokinů je plně reversibilní. Po maximální stimulaci buněčné kultury MG-63 (10 ng/ml, 48 hodin) došlo po 48 hodinách po odstranění IL-1 β z média k návratu míry exprese mRNA pro 11 β HSD1 na úroveň kontrolních vzorků. Podobný efekt byl pozorován také u TNF- α [Cooper a kol., 2001]. Inkubací glomerulárních mesangiálních buněk (glomerular mesangial cells, GMC) a buněčné linie KiKi s cytokiny IL-1 β a TNF- α lze pouze mírně zvýšit expresi mRNA a reduktasovou aktivitu 11 β HSD1. Pokud jsou ale GMC inkubovány v přítomnosti obou těchto cytokinů (oba 5 ng/ml), je dosaženo synergického efektu na expresi 11 β HSD1 a tato je zvýšena přibližně 4x v porovnání s neovlivněnými buňkami. Zvýšení exprese mRNA pro 11 β HSD1 odpovídalo prudkému vzrůstu exprese proteinu 11 β HSD1 (30násobný nárůst), což by mohlo znamenat, že signál je pravděpodobně modulován na úrovni translace. Zajímavé je, že exprese ani aktivita 11 β HSD2 nebyla působením cytokinů IL-1 β a TNF- α ovlivněna [Escher a kol., 1997]. Podobných výsledků lze dosáhnout ovlivněním primární kultury stromálních adipocytů (adipose stromal cells, ASC) cytokiny IL-1 β a TNF- α . Inkubací primokultury ASC s TNF- α (10 ng/ml) lze zvýšit reduktasovou aktivitu 11 β HSD1 17násobně v porovnání s kontrolami a toto

zvýšení je koncentračně závislé. Tento efekt je možné vyvolat u primokultury ASC z omentálního a rovněž subkutánního tuku, ale nikoliv u kultury lidských hepatocytů. Inkubací kultury ASC s IL-1 β lze indukovat expresi a aktivitu 11 β HSD1 a tato indukce je závislá na koncentraci cytokinu. Zajímavým výsledkem rovněž je, že inkubací kultury ASC s růstovým faktorem IGF-1 lze v závislosti na dávce snížit aktivitu 11 β HSD1 v subkutánním (50% pokles při 100 ng/ml) a omentálním (30% pokles při 100 ng/ml), ale ne v primární kultuře lidských hepatocytů. Podobně inkubace kultury ASC s leptinem vedla k nárůstu aktivity 11 β HSD1 o 35 % v omentálním tuku, ale neměla žádný vliv na aktivitu 11 β HSD1 v hepatocytech [Ignatova a kol., 2009].

Jak již bylo uvedeno výše, prozánětlivé cytokiny IL-1 β a TNF- α ovlivňují expresi a aktivitu 11 β -hydroxysteroiddehydrogenas v různých typech buněk a tkání [Cai a kol., 2001; Cooper a kol., 2001]. To vedlo k hypotéze, že změny v expresi a aktivitě 11 β HSD vyvolané účinky prozánětlivých cytokinů (TNF- α , IL-1 β) mohou působit jako zpětná vazba v mechanismu regulace zánětu. Tuto domněnku potvrzují jak studie provedené na pacientech s ulcerózní kolitidou, tak na zvířatech s experimentální kolitidou. Vzorky z biopsií zaníceného střeva pacientů s diagnostikovanou ulcerózní kolitidou vykazovaly zvýšenou expresi mRNA pro 11 β HSD1 a pokles exprese 11 β HSD2. Rovněž bylo zjištěno, že v těchto vzorcích došlo ke zvýšení exprese mRNA pro prozánětlivé cytokiny TNF- α a IL-1 β [Žbáňková a kol., 2007]. U zvířecích modelů (myši, potkanů) se záněty vyvolanými působením např. DSS nebo TNBS rovněž došlo k nárůstu exprese 11 β HSD1 a k poklesu exprese 11 β HSD2 [Bryndová a kol., 2004; Vágnerová a kol., 2006; Ergang a kol., 2008].

Lze předpokládat, že k poklesu exprese 11 β HSD2 v zaníceném střevě dochází v důsledku ztráty přirozené architektury střeva a poškozením epitheliální vrstvy vlivem samotného zánětlivého procesu. Tento efekt byl pozorován u pacientů s IBD [Takahashi a kol., 1999]. Z mých výsledků je ovšem patrné, že úbytek mRNA pro 11 β HSD2 lokalizované v epithelu nemusí nutně souviset s poškozením epithelu, protože v podmínkách mých pokusů zůstal epithel zachován a byl pouze simulován zánětlivý proces přidávkou prozánětlivých cytokinů TNF- α a IL-1 β , a přesto došlo k poklesu mRNA pro 11 β HSD2. Faktorem, který *in vivo* může ovlivňovat aktivitu 11 β HSD1 ve střevu, je rovněž přítomnost specifických populací imunitních buněk. Existuje řada prací, které dokumentují přítomnost lokálního metabolismu v imunitních buňkách. Proces

diferenciace monocytu na makrofág je spojen s indukcí aktivity a transkripčního produktu 11 β HSD1 [Thieringer a kol., 1994]. Intraperitoneálním podáním thioglykolátu do myšího peritonea lze po třech hodinách několikanásobně zvýšit aktivitu 11 β HSD1 v peritoneálním výplachu, který je z velké části tvořen makrofágy a neutrofily [Gilmour a kol., 2006]. Expresi transkripčního produktu, proteinu i aktivitu pro 11 β HSD1 vykazují také specializované populace myších T-lymfocytů CD4⁺, CD8⁺ a dendritické buňky CD11c⁺. V těchto buňkách ale nebyla objevena exprese a ani aktivita 11 β HSD2 [Zhang a kol., 2005]. Thieringer a kol. v roce 2001 demonstrovali, že expresi mRNA pro 11 β HSD1 lze indukovat v monocytech vlivem IL-4 a IL-13. Na druhou stranu žádný z prozánětlivých cytokinů IL-1 β , IL-6 a TNF- α a ani LPS neindukují expresi mRNA 11 β HSD1. Expresi mRNA pro 11 β HSD1 je ale inhibována IFN- γ , který je funkčním antagonistou cytokinů IL-4 a IL-13. Zajímavým příkladem je také indukce aktivity 11 β HSD1 v tymocytech v důsledku popálenin 20 % povrchu myšího těla a tuto aktivitu lze inhibovat inhibitorem 11 β HSD1 kyselinou 18 β -glycyrrhetinovou [D'Elia a kol., 2009]. Dalším příspěvkem k aktivitě 11 β HSD1 ve střevu by mohly představovat imunitní buňky, které přes krevní řečiště procházejí do střevní vrstvy lamina propria. Naivní lymfocyty se dostávají do střeva přes kapiláry v Peyerových placích. Zde se střídavě přichycují a pohybují podle různých cytokinových a chemotaktických signálů. Pakliže nedojde k jejich aktivaci, vracejí se tyto imunitní buňky zpět do krevního řečiště a celý proces se opakuje. Kontakt s buňkou reprezentující antigen (např. dendritická buňka) vyvolá proliferaci a diferenciaci na výkonné populace buněk. Ty se pak navracejí do krevního řečiště a následně se přepravují pouze do tkání, ve kterých došlo k prvnímu kontaktu s antigenem. Tomuto procesu se říká homing of lymphocytes. V průběhu zánětu se pak tyto aktivované a 11 β HSD1 exprimující buňky přemísťují do místa zánětu ve velkém množství a mohou tak zvyšovat lokální metabolismus GC. Z výše uvedených důvodů jsem provedla pokus s orgánovými kulturami, kde je toto „vcestovávání“ imunitních buněk znemožněno. Pokus prokázal, že ke zvýšení 11 β HSD1 dochází vlivem prozánětlivých cytokinů i v *in vitro* modelu distálního tračníku.

Vzhledem k tomu, že střevo je velmi komplexní systém skládající se z řady vrstev, bylo mým dalším úkolem lokalizovat část tračníku, kde dochází ke změnám exprese 11 β HSD vlivem prozánětlivých cytokinů TNF- α a IL-1 β . Enzym 11 β HSD2 je lokalizován zejména v epitheliálních buňkách, zatímco 11 β HSD1 se nachází zejména

v buňkách neepitheliálních [Whorwood a kol., 1994]. Expresi 11 β HSD1 vykazují monocyty a makrofágy [Thieringer a kol., 2001], T-lymfocyty [Hennebold a kol., 1996; Zhang a kol., 2005] a fibroblasty [Hammani a kol., 1991]. Provedla jsem tedy experiment pro zjištění vlivu prozánětlivých cytokinů TNF- α a IL-1 β na kontinuální lidskou epitheliální buněčnou linii odvozenou z kolorektálního adenokarcinomu tračníku HT-29. Vzhledem k výše uvedeným studiím byla u této linie měřena pouze změna exprese 11 β HSD2. U buněčné linie SW620 došlo účinkem TNF- α a 12-myristát-13-acetátu k poklesu aktivity 11 β HSD2 [Kostadinová a kol., 2005]. Pokus s účinkem TNF- α a IL-1 β na buňky HT-29 neprokázal ovlivnění exprese 11 β HSD2 ani jedním ze zkoumaných prozánětlivých cytokinů. Příčinou tohoto výsledku může být odlišné chování adenokarcinomové linie buněk od běžných buněk epitheliálních, jelikož v buňkách mohlo dojít k nádorové transformaci. Je také možné se domnívat, že ke zvýšené expresi 11 β HSD2 v epitheliálních buňkách dochází v důsledku působení jiných buněk střeva. HT-29 je čistě epitheliální linie a došlo zde tedy ke ztrátě kontaktu těchto buněk s myofibroblasty, imunitními buňkami atd.

Mechanismus, jakým TNF α a IL-1 β ovlivňují expresi a aktivitu 11 β -hydroxysteroiddehydrogenas, není dosud znám. Existuje ale hypotéza, že by TNF- α mohl regulovat 11 β HSD1 přes p38 MAPK signální dráhu. Transfekcí buněčné linie HEPG2 lidským promotorem pro 11 β HSD1 dochází ke zvýšení aktivity v proximální části promotoru v přítomnosti TNF- α nebo i bez jeho přítomnosti. Kotransfekcí s lidskými C/EBP α a C/EBP β -LAP vektory lze aktivovat promotor pro 11 β HSD1 s největším efektem [Ignátová a kol., 2009].

7 ZÁVĚR

Mechanismus, kterým se prozánětlivé cytokiny TNF- α a IL- β zapojují do prereceptorového metabolismu glukokortikoidů, a to zejména regulací exprese a aktivity 11 β -hydroxysteroiddehydrogenas typu 1 a 2, není dosud zcela prozkoumán. Mnohé *in vitro* studie ale prokázaly, že tyto cytokiny způsobují nárůst či pokles exprese 11 β HSD1 či 11 β HSD2 v různých typech buněk [Escher a kol., 1997; Cooper a kol., 2001; Thieringer a kol., 2001]. Rovněž existují studie na pacientech s kolitidou [Žbáňková a kol., 2007] a na potkanech s indukovanými záněty [Ergang a kol., 2008; Bryndová a kol., 2004; Vágnerová a kol., 2006], které prokazují, že působení zánětu vyvolává změny v expresi 11 β -hydroxysteroiddehydrogenas. Ověření těchto studií s použitím *in vitro* modelu a simulovaného zánětlivého prostředí bylo jedním z cílů mé práce. Mým úkolem rovněž byla optimalizace podmínek pro uchování orgánových explantátů a volba vhodných normalizačních faktorů pro jednotlivé experimenty. Dalšími cíly mé práce byla lokalizace části tračníku, kde ke změnám exprese dochází, a optimalizace experimentálních podmínek pro pokusy s orgánovými kulturami.

Jako optimální pro udržení orgánových kultur distálního tračníku se ukázala jejich inkubace bez přítomnosti fetálního hovězího séra po dobu 48 hodin. Jako vhodné normalizační faktory byly zvoleny: 18SRNA pro experimenty s inkubací orgánových kultur s prozánětlivými cytokiny TNF- α a IL-1 β a β -aktin pro měření vlivu prozánětlivých cytokinů TNF- α a IL-1 β na epitheliální buněčnou linii HT-29. Mé výsledky dále ukázaly, že působení prozánětlivých cytokinů TNF- α a IL-1 β vyvolává v orgánové kultuře distálního tračníku změny v expresi mRNA pro 11 β HSD1 i 2. Vlivem TNF- α došlo v orgánové kultuře distálního tračníku ke zvýšení exprese 11 β HSD1. Naproti tomu inkubace této orgánové kultury s IL-1 β vyvolalo pokles exprese 11 β HSD2. Podařilo se mi tedy prokázat, že *in vitro* pokus s orgánovou kulturou distálního tračníku vykazuje stejné výsledky jako pokusy *in vivo*. Mé výsledky rovněž ukazují zajímavý fakt, že studované cytokiny zřejmě působí specificky na jednotlivé dehydrogenasy, jelikož TNF- α nevyvolal žádný efekt v expresi 11 β HSD2 a rovněž IL-1 β nijak neovlivnil expresi 11 β HSD1. Uvedené cytokiny neměly žádný signifikantní vliv na expresi 11 β HSD2 u buněčné linie HT-29. To může být způsobeno nádorovou transformací těchto buněk a jejich dlouhým pasážováním, které způsobují jejich odlišné chování od běžných

epitheliálních buněk, nebo se zde může odrážet skutečnost, že efekt cytokinů na epitheliální 11 β HSD2 je zprostředkován buňkami střevní sliznice, které jsou přítomny v orgánové kultuře, ale chybí v čisté linii epitheliálních buněk.

Některé výsledky z této práce byly publikovány v článku pod názvem Upregulation of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase 1 in lymphoid organs during inflammation in the rat v *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 126 (2011) 19-25, autoři: Peter Ergang, Kateřina Vitáčková, Jiří Švec, Jana Bryndová, Ivan Mikšík a Jiří Pácha.

POUŽITÁ LITERATURA

- Agarwal A.K., Monder C., Eckstein B., White P.C.: Cloning and expression of rat cDNA encoding corticosteroid 11 β -dehydrogenase. *J Biol Chem* **264**: 18939-18943 (1989)
- Agarwal A.K., Mune T., Monder C., White P.C.: NAD⁺-dependent isoform of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase. Cloning and characterization of cDNA from sheep kidney. *J Biol Chem* **269**: 25959-25962 (1994)
- Albiston A.L., Obeyesekere V.R., Smith R.E., Krozowski Z.S.: Cloning and tissue distribution of the human 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 2 enzyme. *Mol Cell Endocrinol* **105**: R11-R17 (1994)
- Allera A., Wildt L.: Glucocorticoid-recognizing and -effector sites in rat liver plasma membrane. Kinetics of corticosterone uptake by isolated membrane vesicles- II. Comparative influx and efflux. *J Steroid Biochem Mol Biol* **42**: 757-771 (1992)
- Amelung D., Hubener H.J., Roka L., Meyerheim G.: Conversion of cortisone to compound F. *J Clin Endocrinol Metab* **13**: 1125-1126 (1953)
- Anderson P., Phillips K., Stoecklin G., Kedersha N.: Post-transcriptional regulation of proinflammatory proteins. *J Leukoc Biol* **76**: 42-47 (2004)
- Arriza J.L., Weinberger C., Corelli G., Glaser T.M., Handelin B.L., Houseman D.E., Evans R.M.: Cloning of human mineralocorticoid receptor complementary DNA: structural and functional kinship with glucocorticoid receptor. *Science* **237**: 268-275 (1987)
- Ashwell J.D., Lu F.W., Vacchio M.S.: Glucocorticoids in T cell development and function. *Annu Rev Immunol* **18**: 309-345 (2000)
- Auphan N., DiDonato J.A., Rosette C., Helmberg A., Karin M.: Immunosuppression by glucocorticoids: inhibition of NF-kappa B activity through induction of I kappa B synthesis. *Science* **270**: 286-290 (1995)
- Avanzino G.L., Ermirio R., Ruggeri P., Cogo C.E.: Effect of microelectrophoretically applied corticosterone on raphe neurones in the rat. *Neurosci Lett* **50**: 307-311 (1984)

- Baeuerle P.A., Baltimore D.: I kappa B: a specific inhibitor of the NF-kappa B transcription factor. *Science* **242**: 540-546 (1988)
- Bamberger C.M., Bamberger A.M., de Castr M., Chrousos G.P.: Glucocorticoid receptor b, a potential endogenous inhibitor of glucocorticoid action in humans. *J Clin Invest* **95**: 2435-2441 (1995)
- Barnes P.J., Karin M.: Nuclear factor-kappaB: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. *N Engl J Med* **336**: 1066-1071 (1997)
- Barnes P.J.: Anti-inflammatory actions of glucocorticoids: molecular mechanisms. *Clin Sci* **94**: 557-572 (1998)
- Beato M., Eisfeld K.: Transcription factor access to chromatin. *Nucleic Acids Res* **25**: 3559-3563 (1997)
- Beato M., Chavez S., Truss M.: Transcriptional regulation by steroid hormones. *Steroids* **61**: 240-251 (1996)
- Beato M., Klug J.: Steroid hormone receptors: An update. *Hum Reprod Update* **6**: 225-236 (2000)
- Beato M.: Gene regulation by steroid hormones. *Cell* **56**: 335-344 (1989)
- Beg A.A., Baldwin A.S. Jr.: The I kappa B proteins: multifunctional regulators of Rel/NF-kappa B transcription factors. *Genes Dev* **7**: 2064-2070 (1993)
- Bergmann M., Barnes P.J., Newton R.: Molecular regulation of granulocyte macrophage colony-stimulating factor in human lung epithelial cells by interleukin (IL)-1 β , IL-4, and IL-13 involves both transcriptional and post-transcriptional mechanisms. *Am J Respir Cell Mol Biol* **22**: 582-589 (2000)
- Besedovsky H.O., del Rey A.: Immune-neuro-endocrine interactions: facts and hypotheses. *Endocr Rev* **17**: 64-102 (1996)
- Bodwell J.E., Webster J.C., Jewell C.M., Cidlowski J.A., Hu J.M., Munck A.: Glucocorticoid receptor phosphorylation: overview, function and cell cycle-dependence. *J Steroid Biochem Mol Biol* **65**: 91-99 (1998)

- Bohren K.M., Bullock B., Wermuth B., Gabbay K.H.: The aldo-keto reductase superfamily. cDNAs and deduced amino acid sequences of human aldehyde and aldose reductases. *J Biol Chem* **264**: 9547-9551 (1989)
- Breuner C.W., Greenberg A.L., Wingfield J.: Noninvasive corticosterone treatment rapidly increases activity in Gambel's white-crowned sparrows (*Zonotrichia leucophrys gambelii*). *Gen Comp Endocrinol* **III**: 386-394 (1998)
- Brown R.W., Chapman K.E., Edwards C.R.W., Seckl J.R.: Human placental 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase: evidence for and partial purification of a distinct NAD-dependent isoform. *Endocrinology* **132**: 2614-2621 (1993)
- Bryndová J., Žbáňková S., Kment M., Pácha J.: Colitis up-regulates local glucocorticoid activation and down-regulates inactivation in colonic tissue. *Scand J Gastroenterol* **39**: 549-553 (2004)
- Burton A.F., Anderson F.H.: Inactivation of corticosteroids in intestinal mucosa by 11 beta-hydroxysteroid: NADP oxidoreductase (EC 1.1.1.146). *Am J Gastroenterol* **78**: 627-631 (1983)
- Bush I.E.: 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase: contrast between studies *in vivo* and studies *in vitro*. *Adv Biosci* **3**: 23-39 (1969)
- Cai T., Wong B., Mundt S.S., Thieringer R., Wright S.D., Hermanowski-Vosatka A.: Induction of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 but not 2 in human aortic smooth muscle cells by inflammatory stimuli. *J Steroid Biochem Mol Biol* **77**: 117-122 (2001)
- Colotta F., Re F., Muzio M., Bertini R., Polentarutti N., Sironi M., Giri J.G., Dower S.K., Sims J.E., Mantovani A.: Interleukin-1 type II receptor: a decoy target for IL-1 that is regulated by IL-4. *Science* **261**: 472-475 (1993)
- Condon J., Ricketts M.L., Whorwood C.B., Stewart P.M.: Ontogeny and sexual dimorphic expression of mouse type 2 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase. *Mol Cell Endocrinol* **127**: 121-128 (1997)

- Cooper M.S., Bujalska I., Rabbitt E., Walker E.A., Bland R., Sheppard M.C., Hewison M., Stewart P.M.: Modulation of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase isozymes by proinflammatory cytokines in osteoblasts: an autocrine switch from glucocorticoid inactivation to activation. *J Bone Miner Res* **16**: 1037-1044 (2001)
- Cope C.L., Black E.: The production rate of cortisol in man. *Lancet* **1**:1020-1024 (1958)
- Cope C.L.: Metabolic breakdown. V knize: Cope C.L. (ed.), *Adrenal Steroids and Disease*, London, Pitman Medical: s. 80-104 (1972)
- D'Elia M., Patenaude J., Bernier J.: Regulation of glucocorticoid sensitivity in thymocytes from burn-injured mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **296**: E97-104 (2009)
- Doolan C.M., Condliffe S.B., Harvey B.J.: Rapid non-genomic activation of cytosolic cyclic AMP-dependent protein kinase activity and [Ca²⁺]_i by 17 β -oestradiol in female rat distal colon. *Br J Pharmacol* **129**: 1375-1386 (2000)
- Dostert A., Heinzel T.: Negative glucocorticoid receptor response elements and their role in glucocorticoid action. *Curr Pharm Des* **10**: 2807-2816 (2004)
- Draper N., Stewart P.M.: 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase and the pre-receptor regulation of corticosteroid hormone action. *J Endocrinol* **186**: 251-271 (2005)
- Duax W.L., Ghosh D.: Structure and mechanism of action and inhibition of steroid dehydrogenase enzymes involved in hypertension. *Endocrine Res* **24**: 521-529 (1998)
- Edwards C.R.W., Stewart P.M., Burt D., Brett L., McIntyre M.A., Sutanto W.S., DeKloet E.R., Monder C.: Localisation of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase-tissue specific protector of the mineralocorticoid receptor. *Lancet* **2**: 986-989 (1988)
- Ergang P., Leden P., Bryndova J., Žbáňková S., Mikšík I., Kment M., Pácha J.: Glucocorticoid availability in colonic inflammation of rat. *Dig Dis Sci* **53**: 2160-2167 (2008)
- Escher G., Galli I., Vishwanath B.S., Frey B.M., Frey F.J.: Tumor necrosis factor- α and interleukin-1 β enhance the cortisone/cortisol shuttle. *J Exp Med* **186**: 189-198 (1997)

- Esteban N.V., Loughlin T., Yergey A.L., Zawadzki J.K., Booth J.D., Winterer J.C., Loriaux D.L.: Daily cortisol production rate in man determined by stable isotope dilution/mass spectrometry. *J Clin Endocrinol Metab* **72**: 39-45 (1991)
- Evans R.M.: The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science* **240**: 889-895 (1988)
- Evans S.J., Murray T.F., Moore F.L.: Partial purification and biochemical characterization of a membrane glucocorticoid receptor from an amphibian brain. *J Steroid Biochem Mol Biol* **72**: 209-221 (2000)
- Falkenstein E., Norman A.W., Wehling M.: Mannheim classification of nongenomically initiated (rapid) steroid action(s). *J Clin Endocrinol Metab* **85**: 2072-2075 (2000)
- Feldman S., Dafny N.: Changes in single cell responsiveness in the hypothalamus in cats following cortisol administration. *Brain Res* **20**: 369-377 (1970)
- Filaretov A.A.: The afferent input and functional organization of the hypothalamus in reactions regulating pituitary-adreno-cortical activity. *Brain Res* **107**: 39-54 (1976)
- Flower R.J., Rothwell N.J.: Lipocortin-1: cellular mechanisms and clinical relevance. *Trends Pharmacol Sci* **15**: 71-76 (1994)
- Fukushima D.K., Bradlow H.L., Hellman L., Zumoff B., Gallagher T.F.: Metabolic transformation of hydrocortisone-4-C¹⁴ in normal men. *J Biol Chem* **235**: 2246-2253 (1960)
- Gametchu B., Chen F., Sackey F., Powell C., Watson C.S.: Plasma membrane-resident glucocorticoid receptors in rodent lymphoma and human leukemia models. *Steroids* **64**: 107-119 (1999)
- Gametchu B., Watson C.S., Pasko D.: Size and steroid-binding characterization of membrane-associated glucocorticoid receptor in S-49 lymphoma cells. *Steroids* **56**: 402-410 (1991)
- Gilmour J.S., Coutinho A.E., Cailhier J.F., Man T.Y., Clay M., Thomas G., Harris H.J., Mullins J.J., Seckl J.R., Savill J.S., Chapman K.E.: Local amplification of

- glucocorticoids by 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 promotes macrophage phagocytosis of apoptotic leukocytes. *J Immunol* **176**: 7605-7611 (2006)
- Greene G.L., Gilna P., Waterfield M., Baker A., Hort Y., Shine J.: Sequence and expression of human estrogen receptor complementary DNA. *Science* **231**: 1150-1154 (1986)
- Grilli M., Chiu J.J.-S., Lenardo M.J.: NF-kappa B and Rel: participants in a multiform transcriptional regulatory system. *Int Rev Cytol* **143**: 1-62 (1993)
- Grote H., Ioannou I., Voigt J., Sekeris C.E.: Localization of the glucocorticoid receptor in rat liver cells: Evidence for plasma membrane bound receptor. *Int J Biochem* **25**: 1593-1599 (1993)
- Guo Z., Chen Y.Z., Xu R.B., Fu H.: Binding characteristics of glucocorticoid receptor in synaptic plasma membrane from rat brain. *Funct Neurol* **10**: 183-194 (1995)
- Haller J., Halasz J., Makara G.B., Kruk M.R.: Acute effects of glucocorticoids: Behavioral and pharmacological perspectives. *Neurosci Biobehav Rev* **23**: 337-344 (1998)
- Hammami M.M., Siiteri P.K.: Regulation of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase activity in human skin fibroblasts: enzymatic modulation of glucocorticoid action. *J Clin Endocrinol Metab* **73**: 326-334 (1991)
- Heikkilä M., Peltoketo H., Leppäluoto J., Ilves M., Vuolteenaho O., Vainio S.: Wnt-4 deficiency alters mouse adrenal cortex function, reducing aldosterone production. *Endocrinology* **143**: 4358-4365 (2002)
- Hennebold J.D., Ryu S.-Y., Mu H.-H., Galbraith A., Daynes R.A.: 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase modulation of glucocorticoid activities in lymphoid organs. *Am J Physiol* **270**: R1296-R1306 (1996)
- Hirasawa G., Sasano H., Suzuki T., Takeyama J., Muramatsu Y., Fukushima K., Hiwatashi N., Toyota T., Nagura H., Krozowski Z.S.: 11 Beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 and mineralocorticoid receptor in human fetal development. *J Clin Endocrinol Metab* **84**: 1453-1458 (1999)

- Hollenberg S.M., Weinberger C., Ong E.S., Cerelli G., Oro A., Lebo R., Thompson E.B., Rosenfeld M.G., Evans R.M.: Primary structure and expression of a functional human glucocorticoid receptor cDNA. *Nature* **318**: 635-641 (1985)
- Chang C.S., Kokontis J., Liao S.T.: Molecular cloning of human and rat complementary DNA encoding androgen receptors. *Science* **240**: 324-326 (1988)
- Ibarrola I., Andres M., Marino A., Macarulla J.M., Trueba M.: Purification of a cortisol binding protein from hepatic plasma membrane. *Biochim Biophys Acta* **1284**: 41-46 (1996)
- Ibarrola I., Ogiza K., Marino A., Macarulla J.M., Trueba M.: Steroid hormone specifically binds to rat kidney plasma membrane. *J Bioenerg Biomembr* **23**: 919-926 (1991)
- Ignatová I.D., Kostadinová R.M., Goldring C.E., Nawrocki A.R., Frey F.J., Frey B.M.: Tumor necrosis factor- α upregulates 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 expression by CCAAT/enhancer binding protein- β in HepG2 cells. *Am J Physiol* **296**: E367-E377 (2009)
- Ismaili N., Garabedian M.J.: Modulation of glucocorticoid receptor function via phosphorylation. *Ann N Y Acad Sci* **1024**: 86-101 (2004)
- Ito K., Barnes P.J., Adcock I.M.: Glucocorticoid receptor recruitment of histone deacetylase 2 inhibits IL-1b-induced histone H4 acetylation on lysines 8 and 12. *Mol Cell Biol* **20**: 6891-6903 (2000)
- Ito K., Jazrawi E., Cosio B., Barnes P.J., Adcock I.M.: p65-activated histone acetyltransferase activity is repressed by glucocorticoids: Mifepristone fails to recruit HDAC2 to the p65/HAT complex. *J Biol Chem* **276**: 30208-30215 (2001)
- Jamieson P.M., Chapman K.E., Edwards C.R.W., Seckl J.R.: 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase is an exclusive 11 β -reductase in primary cultures of rat hepatocytes: effect of physiochemical and hormonal manipulations. *Endocrinology* **136**: 4754-4761 (1995)

- Jenkins J.S.: The metabolism of cortisol by human extrahepatic tissues. *J Endocrinol* **34**: 51-56 (1966)
- Jörnvall H., Persson B., Krook M., Atrian S., Gonzalez-Duarte R., Jeffery J., Ghosh D.: Short-chain dehydrogenases/reductases (SDR). *Biochemistry* **34**: 6003-6013 (1995)
- Kamei Y., Xu L., Heinzel T., Torchia J., Kurokawa R., Gloss B., Lin S.C., Heyman R.A., Rose D.W., Glass C.K., Rosenfeld M.G.: A CBP integrator complex mediates transcriptional activation and AP-1 inhibition by nuclear receptors. *Cell* **85**: 403-414 (1996)
- Kendall E.C.: Arthritis. V knize: Kendall E.C. (ed.), *Cortisone*, New York, Charles Scriber's Sons: s. 121-137 (1971)
- Kenouch S., Lombes M., Delahaye F., Eugene E., Bonvalet J.P., Farman N.: Human skin as target for aldosterone: coexpression of mineralocorticoid receptors and 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase. *J Clin Endocrinol Metab* **79**: 1334-1341 (1994)
- Klein K., Henk W.: Clinical experimental studies on the influence of aldosterone on hemodynamics and blod coagulation. *Z Kreisl Forsch* **52**: 40-53 (1963)
- Klemcke H.G., Sampath K.R., Yang K., Vallet J.L., Christenson R.K.: 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase and glucocorticoid receptor messenger RNA expression in porcine placentae: effects of stage of gestation, breed, and uterine environment. *Biol Reprod* **69**: 1945-1950 (2003)
- Kostadinova R.M., Nawrocki A.R., Frey F.J., Frey B.M.: Tumor necrosis factor alpha and phorbol 12-myristate-13-acetate down-regulate human 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 through p50/p50 NF-kappaB homodimers and Egr-1. *FASEB J* **19**: 650-652 (2005)
- Kotelevtsev Y., Holmes M.C., Burchell A., Houston P.M., Schmoll D., Jamieson P., Best R., Brown R., Edwards C.R., Seckl J.R., Mullins J.J.: 11b-Hydroxysteroid dehydrogenase type 1 knockout mice show attenuated glucocorticoid-inducible responses and resist hyperglycemia on obesity or stress. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**: 14924-14929 (1997)

- Krozowski Z., Funder J.W.: Renal mineralocorticoid receptors and hippocampal corticosterone-binding species have identical intrinsic steroid specificity. *Proc Natl Acad Sci USA* **80**: 6056-6060 (1983)
- Krozowski Z., Maguire J.A., Stein-Oakley A.N., Dowling J., Smith R.E., Andrews R.K.: Immunohistochemical localization of the 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type II enzyme in human kidney and placenta. *J Clin Endocrinol Metab* **80**: 2203-2209 (1995)
- Krust A., Green S., Argos P., Kumar V., Walter P., Bornert J.M., Chambon P.: The chicken oestrogen receptor sequence: Homology with v-erbA and the human oestrogen and glucocorticoid receptors. *EMBO J* **5**: 891-897 (1986)
- Kurihara I., Shibata H., Suzuki T., Ando T., Kobayashi S., Hayashi M., Saito I., Saruta T.: Expression and regulation of nuclear receptor coactivators in glucocorticoid action. *Mol Cell Endocrinol* **189**: 181-189 (2002)
- Levine S.J., Benfield T., Shelhamer J.H.: Corticosteroids induce intracellular interleukin-1 receptor antagonist type I expression by a human airway epithelial cell line. *Am J Respir Cell Mol Biol* **15**: 245-251 (1996)
- Liu X., Wang C.A., Chen Y.Z.: Nongenomic effect of glucocorticoid on the release of arginine vasopressin from hypothalamic slices in rats. *Neuroendocrinology* **62**: 628-633 (1995)
- Loosfelt H., Atger M., Misrahi M., Guiochon-Mantel A., Meriel C., Logeat F., Benarous R., Milgrom E.: Cloning and sequence analysis of rabbit progesterone receptor complementary DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* **83**: 9045-9049 (1986)
- Low S.C., Chapman K.E., Edwards C.R., Seckl J.R.: „Liver-type“ 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase cDNA encodes reductase but not dehydrogenase activity in intact mammalian COS-7 cells. *J Mol Endocrinol* **13**: 167-174 (1994)
- Lubahn D.B., Joseph D.R., Sullivan P.M., Willard H.F., French F.S., Wilson E.M.: Cloning of human androgen receptor complementary DNA and localization to the X chromosome. *Science* **240**: 327-330 (1988)

- Martens M.F., Huyben C.M., Hendriks T.: Collagen synthesis in fibroblasts from human colon: regulatory aspects and differences with skin fibroblasts. *Gut* **33**: 1664-1670 (1992)
- Maser E., Friebertshauser J., Völker B.: Purification, characterization and NNK carbonyl reductase activities of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 from human liver: enzyme cooperativity and significance in the detoxification of a tobacco-derived carcinogen. *Chem Biol Interact* **143-144**: 435-448 (2003)
- Maser E., Völker B., Friebertshauser J.: 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 from human liver: dimerization and enzyme cooperativity support its postulated role as glucocorticoid reductase. *Biochemistry* **41**: 2459-2465 (2002)
- McDonnell D.P., Mangelsdorf D.J., Pike J.W., Haussler M.R., O'Malley B.W.: Molecular cloning of complementary DNA encoding the avian receptor for vitamin D. *Science* **235**: 1214-1217 (1987)
- McEwen B.S., Biron C.A., Brunson K.W., Bulloch K., Chambers W.H., Dhabhar F.S., Goldfarb R.H., Kitson R.P., Miller A.H., Spencer R.L., Weiss J.M.: The role of adrenocorticoids as modulators of immune function in health and disease: neural, endocrine and immune interactions. *Brain Res Rev* **23**: 79-133 (1997)
- McGuire J.S., Tomkins G.S.: The multiplicity and specificity of delta4-3-ketosteroid hydrogenases. *Arch Biochem Biophys* **82**: 476-481 (1959)
- Misrahi M., Atger M., d'Auriol L., Loosfelt H., Meriel C., Fridlansky F., Guiochon-Mantel A., Galibert F., Milgrom E.: Complete amino acid sequence of the human progesterone receptor deduced from cloned cDNA. *Biochem Biophys Res Commun* **143**: 740-748 (1987)
- Monder C., Bradlow H.L.: Corticoid acids: explorations at the frontier of corticosteroid metabolism. *Recent Prog Horm Res* **36**: 345-400 (1980)
- Monder C., Lakshmi V.: Evidence for kinetically distinct forms of corticosteroid 11 β -dehydrogenase in rat liver microsomes. *J Steroid Biochem* **32**: 77-83 (1989)

- Monder C., Miroff Y., Marandici A., Hardy M.: 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase alleviates glucocorticoid-mediated inhibition of steroidogenesis in rat Leydig cells. *Endocrinology* **134**: 1199-1204 (1994)
- Monder C., White P.C.: 11 β -Hydroxysteroid dehydrogenase. *Vitamins & Hormones* **47**: 187-271 (1993)
- Moore C.C., Mellon S.H., Murai J., Siiteri P.K., Miller W.L.: Structure and function of the hepatic form of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase in the squirrel monkey, an animal model of glucocorticoid resistance. *Endocrinology* **133**: 368-375 (1993)
- Moore F.L., Orchnik M., Lowry C.: Functional studies of corticosterone receptors and neuronal membranes. *Receptor* **5**: 21-28 (1995)
- Moore F.L., Orchnik M.: Membrane receptors for corticosterone: A mechanism for rapid behavioral responses in an amphibian. *Horm Behav* **28**: 512-519 (1994)
- Muller M., Renkawitz R.: The glucocorticoid receptor. *Biochim Biophys Acta* **1088**: 171-182 (1991)
- Munck A., Guyre P.M., Holbrook N.J.: Physiological functions of glucocorticoids in stress and their relationship to pharmacological actions. *Endocrinol Rev* **5**: 25-44 (1984)
- Munck A., Naray-Fejes-Toth A.: The ups and downs of glucocorticoid physiology. Permissive and suppressive effects revisited. *Mol Cell Endocrinol* **90**: C1-C4 (1992)
- Naray-Fejes-Toth A., Fejes-Toth G.: Expression cloning of the aldosterone target cell-specific 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase from rabbit collecting duct cells. *Endocrinology* **136**: 2579-2586 (1995)
- Newton R., Staples K.J., Hart L., Barnes P.J., Bergmann M.W.: GM-CSF expression in pulmonary epithelial cells is regulated negatively by posttranscriptional mechanisms. *Biochem Biophys Res Commun* **287**: 249-253 (2001)
- Nobel C.S., Dunas F., Abrahmsen L.B.: Purification of full-length recombinant human and rat type 1 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenases with retained oxidoreductase activities. *Protein Expr Purif* **26**: 349-356 (2002)

- Nordeen S.K., Moyer M.L., Bona B.J.: The coupling of multiple signal transduction pathways with steroid response mechanisms. *Endocrinology* **134**: 1723-1732 (1994)
- Nordling E., Jörnvall H., Persson B.: Medium-chain dehydrogenases/reductases (MDR). Family characterizations including genome comparisons and active site modeling. *Eur J Biochem* **269**: 4267-4276 (2002)
- Onate S.A., Tsai S.Y., Tsai M.J., O'Malley B.W.: Sequence and characterization of a coactivator for the steroid hormone receptor superfamily. *Science* **270**: 1354-1357 (1995)
- Orchinik M., Moore F.L., Rose J.D.: Mechanistic and functional studies of rapid corticosteroid actions. *Ann N Y Acad Sci* **746**: 101-112 (1994)
- Orchinik M., Murray T.F., Franklin P.H., Moore F.L.: Guanyl nucleotides modulate binding to steroid receptors in neuronal membranes. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**: 3830-3834 (1992)
- Orchinik M., Murray T.F., Moore F.L.: A corticosteroid receptor in neuronal membranes. *Science* **252**: 1848-1851 (1991)
- Osinski P.A.: Steroid 11 β -ol dehydrogenase in human placenta. *Nature* **187**: 777 (1960)
- Ozols J.: Lumenal orientation and post-translational modifications of the liver microsomal 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase. *J Biol Chem* **270**: 2305-2312 (1995)
- Peterson R.E., Pierce C.E.: The metabolism of corticosterone in man. *J Clin Invest* **39**: 741-757 (1960)
- Powell C.E., Watson C.S., Gametchu B.: Immunoaffinity isolation of native membrane glucocorticoid receptor from S-4911 lymphoma cells: Biochemical characterization and interaction with Hsp 70 and Hsp 90. *Endocrine* **10**: 271-280 (1999)
- Pratt W.B., Toft D.O.: Steroid receptor interactions with heat shock protein and immunophilin chaperones. *Endocr Rev* **18**: 306-360 (1997)
- Pu X., Yang K.: Guinea pig 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1: primary structure and catalytic properties. *Steroids* **65**: 148-156 (2000)

- Pujols L., Mullol J., Roca-Ferrer J., Torrego A., Xaubet A., Cidlowski J.A., Picado C.: Expression of glucocorticoid receptor α - and β -isoforms in human cells and tissues. *Am J Physiol Cell Physiol* **283**: C1324-C1331 (2002)
- Rae M.T., Niven D., Critchley H.O., Harlow C.R., Hillier S.G.: Antiinflammatory steroid action in human ovarian surface epithelial cells. *J Clin Endocrinol Metab* **89**: 4538-4544 (2004)
- Rajan V., Chapman K.E., Lyons V., Jamieson P., Mullins J.J., Edwards C.R.W., Seckl J.R.: Cloning, sequencing and tissue distribution of mouse 11β -hydroxysteroid dehydrogenase-1 cDNA. *J Steroid Biochem Mol Biol* **52**: 141-147 (1995)
- Ray A., Prefontaine K.E.: Physical association and functional antagonism between the p65 subunit of transcription factor NF-kappa B and the glucocorticoid receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**: 752-756 (1994)
- Reiter L.S., Kruithof E.K., Cajot J.F., Sordat B.: The role of the urokinase receptor in extracellular matrix degradation by HT29 human colon carcinoma cells. *Int J Cancer* **53(3)**: 444-450 (1993)
- Ricketts M.L., Verhaeg J., Bujalska I., Howie A.J., Rainey W.E., Stewart P.M.: Immunohistological localization of type 1 11β -hydroxysteroid dehydrogenase in human tissues. *J Clin Endocrinol Metab* **83**: 1325-1335 (1998)
- Roland B.L., Funder J.W.: Localization of 11β -hydroxysteroid dehydrogenase type 2 in rat tissues: *in situ* studies. *Endocrinology* **137**: 1123-1128 (1996)
- Rose J.D., Moore F.L., Orchinik M.: Rapid neurophysiological effects of corticosterone on medullary neurons: Relationship to stress-induced suppression of courtship clasping in an amphibian. *Neuroendocrinology* **57**: 815-824 (1993)
- Rose J.D., Moore F.L.: A neurobehavioral model for rapid actions of corticosterone on sensorimotor integration. *Steroids* **64**: 92-99 (1999)
- Roth S.Y., Denu J.M., Allis C.D.: Histone acetyltransferases. *Annu Rev Biochem* **70**: 81-120 (2001)

- Sandi C., Venero C., Guaza C.: Novelty-related rapid locomotor effects of corticosterone in rats. *Eur J Neurosci* **8**: 794-800 (1996)
- Shackleton C.H.L.: Mass spectrometry in the diagnosis of steroid-related disorders and hypertension research. *J Steroid Biochem Mol Biol* **45**:127-140 (1993)
- Shafqat N., Elleby B., Svensson S., Shafqat J., Jörnvall H., Abrahmsen L., Oppermann U.: Comparative enzymology of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 from glucocorticoid resistant (guinea pig) versus sensitive (human) species. *J Biol Chem* **278**: 2030-2035 (2003)
- Shams M., Kilby M.D., Somerset D.A., Howie A., Gupta A., Wood P.J., Afnan M., Stewart P.M.: 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 2 in human pregnancy and reduced expression in intrauterine growth restriction. *Human Reprod* **13**: 799-804 (1998)
- Scheidereit C., Geisse S., Westphal H.M., Beato M.: The glucocorticoid receptor binds to defined nucleotide sequences near the promoter of mouse mammary tumor virus. *Nature* **304**: 749-752 (1983)
- Scheinman R.I., Cogswell P.C., Lofquist A.K., Baldwin A.S. Jr.: Role of transcriptional activation of I kappa B alpha in mediation of immunosuppression by glucocorticoids. *Science* **270**: 283-286 (1995)
- Sousa A.R., Lane S.J., Nakhosteen J.A., Lee T.H., Poston R.N.: Expression of interleukin-1 beta (IL-1 β) and interleukin-1 receptor antagonist (IL-1 α) on asthmatic bronchial epithelium. *Am J Respir Crit Care Med* **154**: 1061-1066 (1996)
- Stewart P.M., Murry B.A., Mason J.I.: Human kidney 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase is a high affinity nicotinamide adenine dinucleotide-dependent enzyme and differs from the cloned 'type I' isoform. *J Clin Endocrinol Metab* **79**: 480-484 (1994)
- Stewart P.M., Whorwood C.B., Mason J.I.: Type 2 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase in foetal and adult life. *J Steroid Biochem Mol Biol* **55**: 465-471 (1995)

- Sun K., Yang K., Challis J.R.: Differential expression of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase types 1 and 2 in human placenta and fetal membranes. *J Clin Endocrinol Metab* **82**: 300-305 (1997)
- Sun S.C., Ganchi P.A., Ballard D.W., Greene W.C.: NF-kappa B controls expression of inhibitor I kappa B alpha: evidence for an inducible autoregulatory pathway. *Science* **259**: 1912-1915 (1993)
- Suzuki T., Higgins P.J., Crawford D.R.: Control selection for RNA quantitation. *Biotechniques* **29**: 332-337 (2000)
- Takahashi I., Lijima H., Kishi D., Kiyono H.: Oligoclonal Th2-biased betabeta T cells induce murine inflammatory bowel disease. *Immunol Res* **20**: 237-242 (1999)
- Tannin G.M., Agarwal A.K., Monder C., New M.I., White P.C.: The human gene for 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase. Structure, tissue distribution, and chromosomal localization. *J Biol Chem* **266**: 16653-16658 (1991)
- Tetsuka M., Yamamoto S., Hayashida N., Hayashi K.G., Hayashi M., Acosta T.J., Miyamoto A.: Expression of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenases in bovine follicle and corpus luteum. *J Endocrinol* **177**: 445-452 (2003)
- Thieringer R., Le Grand C.B., Carbin L., Cai T.Q., Wong B., Wright S.D., Hermanowski-Vosatka A.: 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 is induced in human monocytes upon differentiation to macrophages. *J Immunol* **167**: 30-35 (2001)
- Tomlinson J.W., Moore J., Cooper M.S., Bujalska I., Shahmanesh M., Burt C., Strain A., Hewison M., Stewart P.M.: Regulation of expression of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 in adipose tissue: tissue-specific induction by cytokines. *Endocrinology* **142**: 1982-1989 (2001)
- Tricarico C., Pinzani P., Bianchi S., Paglierani M., Distant V., Pazzagli M., Bustin S.A., Orlando C.: Quantitative real-time reverse transcription polymerase chain reaction: normalization to rRNA or single housekeeping genes is inappropriate for human tissue biopsies. *Anal Biochem* **309**: 293-300 (2002)

- Trueba M., Guantes J.M., Vallejo A.I., Sancho M.J., Marino A., Macarulla J.M.: Characterization of cortisol binding sites in chicken liver plasma membrane. *Int J Biochem* **19**: 957-962 (1987)
- Trueba M., Ibarrola I., Ogiza K., Marino A., Macarulla J.M.: Specific binding sites for corticosterone in isolated cells and plasma membrane from rat liver. *J Membr Biol* **120**: 115-124 (1991)
- Trueba M., Vallejo A.I., Rodriguez I., Ibarrola I., Sancho M.J., Marino A., Macarulla J.M.: Evidence for the presence of specific binding sites for corticoids in mouse liver plasma membranes. *J Membr Biol* **108**: 115-124 (1989)
- Usugane M., Fujita M., Lipkin M., Palmer R., Friedman E., Augenlicht L.: Cell proliferation in explant cultures of human colon. *Digestion* **24**: 225-233 (1982)
- Vágnerová K., Kverka M., Klusoňová P., Ergang P., Mikšík I., Tlaskalová-Hogenová H., Pácha J.: Intestinal inflammation modulates expression of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase in murine gut. *J Endocrinol* **191**: 497-503 (2006)
- Verrey F.: Early aldosterone effects. *Exp Nephrol* **6**: 294-301 (1998)
- Vilella S., Guerra L., Helmle K.C., Murer H.: Aldosterone actions on basolateral Na⁺/H⁺ exchange in Madin-Darby canine kidney cells. *Pfluegers Arch* **422**: 9-15 (1992)
- Walker B.R., Connacher A.A., Webb D.J., Edwards C.R.: Glucocorticoids and blood pressure: a role for the cortisol/cortisone shuttle in the control of vascular tone in man. *Clin Sci* **83**: 171-178 (1992)
- Walter K.A., Bennett G.N., Papoutsakis E.T.: Molecular characterization of two *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 butanol dehydrogenase isozyme genes. *J Bacteriol* **174**: 7149-7158 (1992)
- Wehling M.: Specific, nongenomic actions of steroid hormones. *Annu Rev Physiol* **59**: 365-393 (1997)
- Whitworth J.A., Stewart P.M., Burt D., Atherden S.M., Edwards C.R.W.: The kidney is the major site of cortisone production in man. *Clin Endocrinol* **31**: 355-361 (1989)

- Whorwood C.B., Mason J.I., Ricketts M.L., Howie A.J., Stewart P.M.: Detection of human 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase isoforms using reverse-transcriptase-polymerase chain reaction and localization of the type 2 isoform to renal collecting ducts. *Mol Cell Endocrinol* **110**: R7-R12 (1995)
- Whorwood C.B., Ricketts M.L., Stewart P.M.: Epithelial cell localization of type 2 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase in rat and human colon. *Endocrinology* **135**: 2533-2541 (1994)
- Wu B., Li P., Liu Y., Lou Z., Ding Y., Shu C., Ye S., Bartlam M., Shen B., Rao Z.: 3D structure of human FK506- binding protein 52: implications for the assembly of the glucocorticoid receptor/Hsp90/immunophilin heterocomplex. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**: 8348-8353 (2004)
- Yang K., Smith C.L., Dales D., Hammond G.L., Challis J.R.: Cloning of an ovine 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase complementary deoxyribonucleic acid: tissue and temporal distribution of its messenger ribonucleic acid during fetal and neonatal development. *Endocrinology* **131**: 2120-2126 (1992)
- Yao T.P., Ku G., Zhou N., Scully R., Livingston D.M.: The nuclear hormone receptor coactivator SRC-1 is a specific target of p300. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**: 10626-10631 (1996)
- Yong P.Y., Harlow C., Thong K.J., Hillier S.G.: Regulation of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 gene expression in human ovarian surface epithelial cells by interleukin-1. *Hum Reprod* **17**: 2300-2306 (2002)
- Zhang T.Y., Ding X., Daynes R.A.: The expression of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type I by lymphocytes provides a novel means for intracrine regulation of glucocorticoid activities. *J Immunol* **174**: 879-889 (2005)
- Žbáňková S., Bryndová J., Leden P., Kment M., Švec A., Pácha J.: 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase 1 and 2 expression in colon from patients with ulcerative colitis. *J Gastroenterol Hepatol* **22**: 1019-1023 (2007)

Svoluji k zapůjčení této práce pro studijní účely a prosím, aby byla řádně vedena evidence vypůjčovatelů.

[illegible]